



FANCM et ses cofacteurs MHF1-MHF2, ainsi que FIDGETIN-Like-1 limitent la formation des crossovers méiotiques chez *Arabidopsis thaliana*

Chloé Girard

► To cite this version:

Chloé Girard. FANCM et ses cofacteurs MHF1-MHF2, ainsi que FIDGETIN-Like-1 limitent la formation des crossovers méiotiques chez *Arabidopsis thaliana*. Génétique des plantes. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. <NNT : 2014PA112259>. <tel-01186060>

HAL Id: tel-01186060

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01186060>

Submitted on 24 Aug 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de
l'Université Paris Sud

Institut Jean-Pierre Bourgin
INRA de Versailles
Ecole Doctorale Sciences du Végétal

Discipline : BIOLOGIE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Sud

**FANCM et ses cofacteurs MHF1-MHF2,
ainsi que FIDGETIN-Like-1
limitent la formation des crossovers
méiotiques chez *Arabidopsis thaliana***

PAR : Chloé GIRARD

MEMBRES DU JURY:

Rapporteur : Dr. Valérie BORDE, DR Institut Curie Paris

Rapporteur : Dr. Bernard DE MASSY, DR IGH Montpellier

Examineur : Dr. Olivier HAMANT, DR INRA ENS de Lyon

Examineur : Pr. Jacqui SHYKOFF, DR CNRS U-PSud Paris

Examineur : Dr. Denise ZICKLER, DR CNRS U-PSud Paris

Directeur de thèse : Dr. Raphaël MERCIER, DR INRA Versailles

Date de soutenance : 03 Octobre 2014

If science teaches us anything,
it teaches to accept our successes as well as our failures,
with quiet grace and dignity
Gene Wilder

Table des matières

1	Contexte et objectifs des travaux de thèse	1
1.1	Objectifs	1
1.2	Un peu d'histoire	3
1.3	Pourquoi faire du sexe et de la recombinaison ?	5
1.3.1	Les coûts de la reproduction sexuée sont importants	5
1.3.2	Le sexe et la recombinaison procurent un avantage sélectif dans un environnement changeant	6
I	Introduction	8
1	Description cytologique de la méiose	9
1.1	La méiose : réduction de la ploïdie et recombinaison	9
1.1.1	Première division réductionnelle, seconde division équationnelle . .	11
1.1.2	Importance de la recombinaison pour la fertilité	11
1.2	La prophase de méiose	13
1.2.1	Mise en place des axes chromosomiques	15
1.2.2	Formation du bouquet et alignement pré-synaptique	17
1.2.3	Mise en place du complexe synaptonémal	18
1.2.4	Recombinaison et cytologie	20
1.2.4.1	SC et recombinaison	20
1.2.4.2	Progression de la prophase et de la recombinaison	20
2	Description moléculaire de la recombinaison méiotique	24
2.1	Formation et maturation des cassures double brin	24
2.1.1	SPO11 et les protéines partenaires	24
2.1.2	Régulation de la formation des cassures double brin	25
2.1.2.1	Modèle de formation des cassures double-brin	25
2.1.2.2	Positions des cassures double-brin dans le génome	27
2.1.2.3	Régulation du niveau de cassures double-brin	28
2.1.3	Maturation des cassures doubles-brins	29
2.2	L'invasion simple brin	31

2.2.1	RAD51 et DMC1, deux recombinaases	31
2.2.2	RAD51 indispensable à la réparation	32
2.2.3	DMC1 et le biais inter-homologue	34
2.2.3.1	Modèles de chargement de DMC1 et RAD51 autour des cassures	37
2.2.4	Le biais par les protéines de l'axe	39
2.3	Les voies de formation des crossovers	40
2.3.1	Les protéines ZMM	40
2.3.2	La voie MUS81	44
2.3.3	Résolution des doubles-jonctions de Holliday et formation des CO de voie I	46
2.3.4	Dynamique de la recombinaison et formation des NCO	47
2.3.5	Comment reconnaître son chromosome homologue ?	49
2.3.6	Comment différencier son chromosome homologue de son homéo- logue ?	50
3	Régulation des événements de crossovers	52
3.1	Observations génétiques et cytologiques	52
3.1.1	Le crossover obligatoire	52
3.1.2	Une limitation du nombre de CO par chromosome et par cellule . .	53
3.1.2.1	L'interférence : observations cytologiques et génétiques . .	55
3.2	L'interférence des crossovers : mesures et modèles	56
3.2.1	Comment mesurer l'interférence ?	56
3.2.2	Des mutants affectés dans l'interférence ?	59
3.2.3	Comment est implémentée l'interférence ?	62
3.2.4	Les modèles de l'interférence	62
3.3	Des protéines anti-CO connues	64
3.3.1	Des protéines anti-CO méiotiques	64
3.3.2	Quid des protéines anti-CO mitotiques ?	66
4	La voie Fanconi de réparation de l'ADN	69
4.1	L'anémie de Fanconi, une maladie humaine	69
4.2	Rôle somatique des protéines Fanconi	70
4.2.1	Les protéines du complexe principal	70
4.2.1.1	FANCM	73
4.2.1.2	FAPP24, MHF1 et MHF2, des cofacteurs de FANCM . . .	74
4.2.2	Le complexe FA-ID, FAN1 et les partenaires en aval	74

4.3	Indications pour de nombreux sous-complexes indépendants de la voie FA .	75
4.4	Implication des protéines Fanconi en méiose	75
5	Les AAA-ATPases	77
5.1	Qu'est-ce qu'une AAA-ATPase ?	77
5.1.1	Structure protéique des AAA-ATPases	78
5.1.2	Relation structure fonction des AAA-ATPases	79
5.1.3	Des substrats très variés	79
5.2	Phylogénie des AAA-ATPases	81
5.2.1	Le clade des AAA-ATPases dites "méiotiques"	82
5.2.1.1	Les protéines de désassemblage des microtubules	82
5.2.1.2	Fidgetin, une protéine aux multiples fonctions	83
5.2.2	Pch2, une protéine du groupe BSC1 impliquée en méiose	87
II	Résultats	89
1	FANCM, un régulateur majeur de la formation des crossovers méio- tiques	92
1.1	Introduction et Résumé	92
1.2	Article 1 : FANCM limits meiotic crossovers	93
2	Implication de la voie Fanconi dans le contrôle de la formation des cros- sovers méiotiques	117
2.1	Introduction et Résumé	117
2.2	Article 2 : FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers	118
3	FIGL1 limite la formation des crossovers	153
3.1	Introduction et Résumé	153
3.2	Article 3 : Meiotic non-interfering crossovers are limited at two different steps : one depends on FIDGETIN-LIKE 1, the other on FANCM	155
3.3	Résultat supplémentaire	196
3.3.1	<i>figl1</i> haploïde	196
III	Discussion et perspectives	198
1.2	La voie FA et la recombinaison méiotique	199
1.2.1	MHF1, MHF2 et FANCM : trois protéines, une voie de régulation .	199

1.2.2	Un rôle pro CO des autres protéines fanconi ?	200
1.2.3	FANCM, RTEL-1, SGS1 : dissociation des D-loop ?	200
1.2.4	Effet de <i>fancm</i> en fond hybride	202
1.3	FIGL1 : une nouvelle protéine méiotique	203
1.3.1	Qui est FIGL1 ?	203
1.3.2	Ce que l'étude de <i>figl1</i> nous apprend sur DMC1 et RAD51	204
1.3.3	Comment caractériser la fonction de FIGL1	205
1.3.4	La fonction de FIGL1 est-elle conservée ?	206
1.3.5	Le biais sur l'homologue ou le biais sur la sœur ?	208
1.4	D'autres cribles possibles ?	209
1.5	Pourquoi le nombre de crossovers serait-il limité ?	210
Bibliographie		214
IV Annexe		251
Sommaire		

Table des figures

1.1	La méiose : deux divisions	10
1.2	Le chiasma est essentiel à la ségrégation	12
1.3	La prophase chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
1.4	Réarrangement de la chromatine en prophase	16
1.5	Mise en place du complexe synaptonémal chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.6	Localisation de la protéine DMC1 comme un marqueur des DSB chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.7	Immunolocalisation des protéines HEI10 et MLH1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.1	L'intensité de formation des DSB n'est pas uniforme	26
2.2	Formation des DSB et résection	30
2.3	Invasion simple brin et formation de la D-loop	38
2.4	Voies de formation des CO et NCO	41
2.5	Formation et résolution des double-jonctions de Holliday	45
2.6	La formation des CO et des NCO est dynamique	48
3.1	Le nombre de CO est limité par chromosome	53
3.2	Relation entre taille des chromosomes et nombre de CO	54
3.3	L'équation de Perkins	58
3.4	Calculs de l'interférence	60
4.1	La voie FA de réparation de l'ADN	72
5.1	Motifs conservés des AAA-ATPases	78
5.2	Les AAA-ATPases adoptent une conformation hexamérique	80
5.3	Phylogénie des AAA-ATPase	82
5.4	La famille des protéines Katanin, Spastin et Fidgetin	84
5.5	Localisation des différentes protéines Fidgetin	86
3.1	Résultat supplémentaire : <i>figl1</i> haploïde	197

Liste des tableaux

2.1	Les mutants de l'invasion et du biais chez <i>Arabidopsis</i>	33
2.2	Les protéines de l'invasion simple brin et du biais inter-homologue	35
2.3	Les protéines ZMM	43
4.1	Les protéines de la voie Fanconi	71
1	Bilan des cribles <i>zmm</i>	91

Abbréviations

A

AAA : ATPase Associées à divers Activités cellulaires

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AE : *axial element*, élément axial du SC

AFMF : association française de la maladie de Fanconi

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : enzyme capable d'hydrolyser l'ATP

C

CDK : *cyclin dependent kinase*, kinase dépendante de cycline

CE : *central element*, élément central du SC

cM : centiMorgan

CO : crossover

CoC : *coefficient of coincidence*, coefficient de coïncidence

D

Da : Dalton

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole, colorant de l'ADN

dHj : *double Holliday junction*, double-jonction de Holliday

DSB : *double strand break*, cassures double brin

F

FA : *Fanconi Anemia*, anémie de Fanconi

FRBD : *FIGL1's RAD51 binding domain*, domaine de FIGL1 d'interaction avec RAD51

G

GC : *gene conversion*, conversion génique

GTP : guanosine triphosphate

H

H3K4me : méthylation de la lysine (K) 4 de l'histone (H) 3

hDNA : hétéroduplexe d'ADN présentant du polymorphisme

Hj : *Holliday junction*, simple jonction de Holliday

HR : *homologous recombination*, recombinaison homologue

I

ICL : *inter-strand crosslink*, liaison covalente entre les deux brins complémentaires de l'ADN

INDELs : insertion/délétions

IR : *Interference Ratio*, ratio d'interférence

K

kb : kilobase (1 000 bases d'ADN)

kDa : kilo-Dalton

L

L_{CoC} : longueur pour laquelle le $CoC = 0.5$

LND : *low nucleosome density*, région de faible densité en nucléosome

M

Mb : Megabase (1 million de bases d'ADN)

MIT : *microtubule interacting domain*, domaine d'interaction aux microtubules

MMC : mitomycin C

MMR : *mismatch repair pathway* voie de réparation des mésappariements

N

NCO : non-crossover

NDR : *nucleosome depleted region*, région dépourvue de nucléosomes

NHEJ : Non-Homologous End Joining, jonction d'extrémités non-homologues

NPD : tétrade de type *non parental dytype*, "dytype non parentaux"

NTP : nucléotide triphosphate

P

P : tétrade de type parentale (spores non recombinaées)

pb : paire de bases d'ADN

R

RNAi : *RNA interference*, interférence à ARN.

S

SC : *synaptonemal complex*, complexe synaptonémal

SCE : *sister chromatid exchange*, échange de chromatides sœurs

SEC : *second-end capture*, capture du second brin

SEI : *single-end invasion*, invasion simple brin

SNP : *single nucleotide polymorphism*, polymorphisme ponctuel touchant 1pb

SRH : *Second Region of Homology*, deuxième région d'homologie des AAA-ATPases

T

T : tétrade de type *tetratype*

TLS : *translesion synthesis*, synthèse d'ADN capable de surmonter les lésions

V

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Contexte et objectifs des travaux de thèse

1.1 Objectifs

L'apparition de la reproduction sexuée chez les eucaryotes est estimée à 1.5 milliard d'années (BERNSTEIN et al. 2012). Ce type de reproduction comporte des mécanismes uniques pour assurer son bon déroulement. La méiose est la pierre angulaire de la reproduction sexuée, et assure le passage d'une phase diploïde à une phase haploïde. La méiose produit les cellules spécialisées dans la reproduction, les spores, qui sont haploïdes : la méiose comporte deux divisions successives sans réplication intermédiaire. La première division sépare les chromosomes homologues, tandis que la deuxième sépare les chromatides sœurs. La diploïdie est restaurée lorsque deux gamètes, dérivés des spores, se rencontrent pour former un nouvel individu.

Chez la très grande majorité des espèces, la bonne disjonction des chromosomes homologues en première division de méiose repose sur la formation des crossovers (CO), qui sont des échanges réciproques de matériel génétique entre deux chromosomes homologues. Les CO sont formés par un ensemble de mécanismes regroupés sous le nom de recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR). Chez ces espèces, on observe qu'au moins un crossover est formé pour chaque paire de chromosomes homologues, c'est ce que l'on appelle le CO obligatoire. A l'inverse, en comparant les cartes génétiques disponibles chez de nombreuses espèces couvrant les trois règnes eucaryotes, le nombre de CO semble aussi contraint par une limite supérieure. Les mécanismes qui limitent la formation des crossovers ne sont pas bien connus ni compris. Comprendre la recombinaison c'est comprendre comment sont redistribuées les cartes à chaque nouvelle partie de poker, et c'est avec cette idée que je me suis intéressée à la méiose et à la recombinaison.

Au sein de l'équipe Méiose et Recombinaison de l'INRA de Versailles, des cribles génétiques ont permis d'identifier des mutants du contrôle de la fréquence des crossovers et j'ai pu entreprendre l'identification et la caractérisation des gènes impliqués. Le premier projet a abouti à la découverte de l'hélicase FANCM comme un régulateur majeur de la

recombinaison méiotique (CRISMANI et al. 2012). Deux co-facteurs de FANCM ont ensuite été impliqués dans la même voie, MHF1 et MHF2 (GIRARD et al. 2014, sous presse). Ces cribles m'ont ensuite menée à étudier la protéine FIDGETIN-Like-1 (FIGL1) et son rôle dans la formation des crossovers, ou plutôt dans la non-formation des crossovers.

Ce manuscrit retrace les grands fondamentaux sur ce que l'on connaît aujourd'hui de la méiose et de la recombinaison, qui nous ont permis de mener nos projets et de formuler nos hypothèses. Je m'attacherai donc d'abord à situer le contexte de nos recherches en présentant des aspects historiques des découvertes sur la méiose et la recombinaison ainsi que quelques hypothèses sur l'intérêt de faire du sexe et de la recombinaison à l'échelle évolutive (page 5). Je traiterai ensuite des aspects cytologiques de la méiose, en m'appuyant sur *Arabidopsis thaliana*, et en restant proches des observations, sans rentrer dans les détails (page 9). Je présenterai les acteurs moléculaires de la recombinaison méiotique (page 24), pour m'intéresser ensuite à la régulation des événements de crossovers (page 52), clé de voûte du thème qui nous préoccupe. J'introduirai ensuite des notions qui seront importantes pour comprendre la portée de nos résultats. Je présenterai rapidement la voie Fanconi Anemia dont FANCM est un des acteurs principaux (page 69) ainsi que la famille des AAA-ATPases, dont FIGL1 fait partie (page 77). Mes résultats apparaissent sous forme d'articles : deux ont été publiés et un troisième est en cours d'écriture (page 90). La discussion reprendra les grandes idées développées dans les deux premières parties et s'attachera à discerner les grandes conclusions et les perspectives de mon travail (page 199).

Par souci d'homogénéité et de cohérence avec la littérature, les abréviations seront utilisées en langue anglaise avec leur définition en français (exemple : cassure double brin, *double strand break*, DSB). Elles sont récapitulées à la page 12. De plus la nomenclature d'appellation des gènes, protéines et mutants suivra celle d'*Arabidopsis thaliana* : *GENES*, *PROTEINES* et *mutants*.

1.2 Un peu d'histoire

C'est l'une des grandes ironies de l'histoire des sciences que les réponses aux problèmes de l'hérédité aient déjà été trouvée en 1865 par Gregor Mendel, alors que les spéculations les plus débridées ont été publiées entre 1870 et 1890 (pour revue, voir MAYR 1982). Après la redécouverte des travaux de Mendel dans les années 1900, le développement de la génétique fut presque explosif. Le concept qui révolutionna la génétique était que chaque caractère se voyait représenté dans l'individu par deux, et seulement deux, facteurs ; l'un provenant de la mère, l'autre du père. L'idée que les lois de Mendel étaient une conséquence de l'organisation du matériel génétique sous forme de chromosome fut ensuite suggérée par Montgomery, Correns, Sutton, Wilson et Boveri. Sutton et Boveri présentèrent en 1902 une argumentation détaillée de leurs conclusions, que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de "théorie chromosomique de l'hérédité". C'est Boveri qui établit que les chromosomes, en grec "corps de couleur", suivent les mêmes règles que les caractères génétiques, c'est-à-dire qu'ils ségrègent dans les cellules filles et qu'ils portent chacun une information génétique différente. Sutton et Boveri postulèrent alors que les gènes, les "éléments" de Mendel, étaient situés sur les chromosomes et que chaque chromosome possédait son propre assortiment de gènes. Sturtevant fut le premier à parler d'allèle en 1913. Les recherches de Morgan sur les "yeux blancs" de la drosophile établirent qu'un gène pouvait muter pour donner un nouvel allèle, et que cet allèle pouvait se transmettre tel quel à la descendance.

Le comportement des chromosomes lors de la formation des gamètes fut une source d'étonnement pour de nombreux cytologistes. Il fut rapidement établi que les noyaux des ovules et des spermatozoïdes étaient haploïdes, la question fut alors de savoir comment se réalisait la division du stock chromosomique, et comment cela pouvait jouer un rôle dans la transmission héréditaire. Les mécanismes de liaison génétique furent mis au jour par de Vries en 1903. Il postula qu'il existait des échanges d'unités entre les chromosomes parentaux appariés en prophase, et que ces échanges étaient réciproques. En 1909, Janseens émis l'hypothèse que lorsque les quatre chromatides sont enroulées les unes avec les autres, l'une des quatre pouvait se briser en un point et pouvait se ressouder avec une des chromatides du chromosome homologue, permettant ainsi le réarrangement des allèles parentaux. Il parle alors d'entrecroisement des chromosomes, que l'on appelle aujourd'hui crossover. Morgan et ses collaborateurs du "labo des mouches" exprimèrent les premiers que la probabilité de ces entrecroisements était facteur de la distance physique entre deux facteurs et construisirent l'unité de distance génétique, le centiMorgan. Sur la base de ce raisonnement, Sturtevant, du haut de ses 19 ans, put calculer l'ordre et la position successive des gènes, et établir ainsi la première carte génétique.

Robin Holliday fut celui qui postula l'existence d'un intermédiaire de recombinaison spécifique à la formation des crossovers : la jonction de Holliday. Quatre ans après la découverte que l'ADN pouvait effectivement être coupé et relié (MESELSON 1964), Robin Holliday propose qu'une structure à quatre branches expliquerait les résultats de ségrégation génétique, et notamment les conversions géniques (Holliday R. dans PEACOCK et al. 1968). Ces hypothèses furent confirmées par des observations en microscopie électronique en 1976 (POTTER et al. 1976), et réaffirmées depuis par toutes les études de recombinaison somatique et méiotique (LIBERI et al. 2010).

1.3 Pourquoi faire du sexe et de la recombinaison ?

La reproduction sexuée est très largement répandue chez les eucaryotes. Chez les métazoaires, les rares cas connus d'asexualité sont associés à des épisodes de reproduction sexuée, et chez les plantes, si les cas d'asexualité sont assez répandus, moins de 1% des Angiospermes seraient strictement asexuées (WHITTON et al. 2008). Chez les champignons, les rares espèces dont le cycle sexuel n'a pas été observé (rassemblés sous le nom de Deutéromycètes) possèdent tout de même des traces de reproduction sexuée dans leur génome (BOURNE et al. 2013; PONTERCORVO et al. 1953). Et pourtant, faire de la reproduction sexuée a un coût important, parfois tellement élevé que certaines espèces ont acquis des systèmes de restriction pour la limiter aux moments où cela leur est le moins préjudiciable, comme c'est le cas chez les levures qui ne font de la méiose qu'en cas de pénurie de substrats alimentaires (HERSKOWITZ 1988), alors que la croissance et la reproduction par mitose est compromise. Les biologistes de l'évolution parlent de **paradoxe du sexe**.

1.3.1 Les coûts de la reproduction sexuée sont importants

Les coûts de la reproduction sexuée peuvent être de deux types : ceux qui proviennent du fait d'avoir deux sexes distincts et de mélanger les chromosomes entre les individus (brassage inter-chromosomique) et ceux qui proviennent de la recombinaison (brassage intra-chromosomique). Le sexe et la recombinaison sont hautement liés : toutes les espèces qui font de la reproduction sexuée font de la recombinaison, au moins dans un des deux sexes (voir I.1.1.2), et à l'exception du rotifère bdéloïde pour qui l'absence de sexe et de recombinaison a été génétiquement démontrée (FLOT et al. 2013), aucune espèce n'a été identifiée comme strictement incapable de faire de la recombinaison.

Le premier coût du sexe vient d'abord de l'anisogamie des gamètes des espèces sexuées : les mâles n'investissent que très peu d'énergie dans la fabrication de leur gamète, qui parasitent en quelque sorte les gamètes femelles, qui eux sont chargés en nutriments qui vont permettre le développement d'un nouvel individu. En d'autres termes, les gamètes mâles ne participent pas à l'expansion démographique, et seule la moitié des individus est capable de porter la génération suivante. C'est ce qu'on appelle **le coût du sexe double** (*the two-fold cost of sex*), aussi appelé coût de production des mâles (LEHTONEN et al. 2012). Du point de vue du gène égoïste (DAWKINS 2006), seule la moitié des gènes de chaque individu est transmise à la génération suivante, alors que la reproduction asexuée permet d'en transmettre l'intégralité (**coût de dilution du génome**). De nombreux autres coûts peuvent encore s'ajouter à ceux là : choix du partenaire, temps que prend la

méiose par rapport à la mitose, etc. (détaillé dans LEHTONEN et al. 2012).

La recombinaison est aussi couteuse car elle casse les combinaisons d'allèles qui, chez les espèces à reproduction asexuée, restent fixées. Si ces combinaisons sont bénéfiques pour l'hôte, les descendants risquent d'avoir une moins bonne fitness que leur parents : on parle de **fardeau de la recombinaison** (*recombination load*). La recombinaison aurait donc tendance à casser les bonnes associations d'allèles, qui ne peuvent pas être transmises à la descendance.

Toutes ces observations laissent penser que les coûts du sexe et de la recombinaison prédominent sur leurs avantages, et qu'un gène induisant de la reproduction asexuée donnerait un avantage à court terme important et se répandrait de fait rapidement dans les populations. Dans ce cadre, comment expliquer la prévalence de la reproduction sexuée dans l'arbre du vivant ?

1.3.2 Le sexe et la recombinaison procurent un avantage sélectif dans un environnement changeant

Le sexe et la recombinaison ont des coûts à court terme très importants. Des pistes peuvent tout de même être proposées pour expliquer la maintenance du sexe chez les eucaryotes.

Un premier argument en faveur du sexe est que les croisements permettent d'associer des allèles de fonds génétiques différents, alors que dans le cas de la reproduction asexuée, **l'interférence clonale** fait que les mutations favorables apparaissant dans deux individus différents seront toujours en compétition l'une avec l'autre. La reproduction sexuée accélérerait donc l'évolution des espèces (MAYNARD-SMITH 1998).

Pour expliquer la prévalence de la recombinaison, on avance aussi souvent l'argument qu'elle permet de créer de **nouvelles combinaisons d'allèles** sur lesquelles la sélection peut jouer (BURT 2000). Cette affirmation empirique a longtemps été mise à mal par les modèles mathématiques en raison du coût élevé du fardeau de recombinaison, à cause duquel les descendants issus de la reproduction sexuée n'ont pas toujours une meilleure fitness que leurs parents (OTTO et al. 2002). Mais ces modèles ont plusieurs failles. Tout d'abord, les associations alléliques favorables à un temps t ne le sont pas forcément à un temps $t+1$. C'est notamment l'hypothèse dite de la **Reine Rouge**, en référence au roman de Lewis Carol, *De l'autre côté du miroir*, où Alice est contrainte de courir au côté de la Reine Rouge afin de rester au même endroit (VAN VALEN 1973). Cette situation est comparable à une course à l'armement en co-évolution antagoniste, par exemple entre hôtes et parasites, et se présente souvent dans des cas où les individus sont en situation de défense contre les parasites (GREEN et al. 2013) ou en réponse à des changements abiotiques

imprévisibles, etc. Non seulement la sélection varie en fonction du temps, mais elle varie aussi en fonction de l'espace, et des associations d'allèles favorables à un environnement ne le seront plus forcément après **migration** (ROUSSELLE et al. 2010).

Un argument de plus en faveur de la reproduction sexuée est que le fardeau de la recombinaison n'est vraiment lourd que dans le cas de population infinie où la dérive génétique ne s'applique pas (OTTO et al. 2002). Dans des populations infinies, la sélection arrive à fixer de bonnes combinaisons d'allèles, et dès que ces bonnes combinaisons sont fixés, le sexe perd tous ses avantages dans des environnements stables et homogènes. Dans les cas, réels, de population finies, la dérive permet la fixation des allèles, qu'ils soient positifs ou délétères. Les "bons" allèles se retrouvent vite génétiquement liés à des allèles "délétères" (effet de Hill-Robertson, HILL et al. 1968). Dans ces populations finies, la sélection épuise vite les ressources de variations directement accessibles (i.e. sans recombinaison). La recombinaison permet de réintroduire de la variation, de séparer le destin d'un allèle de son fond génétique (ce qui est aussi bon du point de vue du gène égoïste, qui peut s'échapper).

La recombinaison permet à de nouveaux génotypes d'émerger rapidement, pour être compétitifs face à la sélection. Prenons l'exemple d'une partie de poker. Chaque joueur dispose d'une série de cartes, et la combinaison de ces cartes peut lui procurer un avantage pour gagner par rapport à ses adversaires. Si les règles ne changent pas, la meilleure main reste la meilleure, et il n'y a aucune intérêt à redistribuer les cartes (il vaut mieux faire de la reproduction asexuée). Au contraire, si les règles changent (si les pressions de sélection changent), il vaut mieux remettre en jeu sa main dans l'espoir d'en tirer une qui satisfera les nouvelles règles (il vaut mieux mélanger ses gènes pour s'adapter aux nouvelles pressions de sélection). Dans un monde homogène et statique, où les pressions de sélection ne varient pas, la reproduction sexuée n'aurait peut-être jamais apporté un avantage vis à vis de la reproduction asexuée (OTTO et al. 2002).

Expliquer la mise en place de la reproduction sexuée et son maintien au cours de l'évolution reste encore un défi majeur des biologistes de l'évolution, notamment parce que les modèles manquent souvent de données de terrain sur lesquelles tester les hypothèses. Il est clair que la stratégie sexuelle est présente chez l'immense majorité des organismes, malgré les coûts qu'elle entraîne, et que le paradoxe du sexe n'est encore aujourd'hui pas complètement résolu.

PREMIÈRE PARTIE

Introduction

Description cytologique de la méiose

La cytogénétique est une branche de la génétique qui s'attache à observer, décrire et comprendre les structures cellulaires, et notamment les chromosomes. Les chromosomes furent décrits par Nägeli en 1842, puis par Flemming en 1882, qui le premier observa la mitose (en grec *mitos*, le filament, en référence à l'aspect des chromosomes). En méiose, les techniques d'étalement chromosomique de méiocytes permettent d'observer le comportement des chromosomes chez de nombreuses espèces. Ce chapitre soulignera l'importance de la formation des crossovers en méiose (page 11), et je m'attacherai ensuite à décrire les différents stades de la prophase de méiose chez *Arabidopsis thaliana*, pour montrer notamment la progression des événements cytologiques (page 18) en lien avec la progression de la recombinaison.

1.1 La méiose : réduction de la ploïdie et recombinaison

La méiose est une division cellulaire particulière qui mène à la formation des spores, cellules spécialisées dans la reproduction sexuée. Lors de l'entrée en méiose, les chromosomes répliqués vont s'apparier, s'engager dans la recombinaison, puis subir deux divisions successives (méiose I et méiose II) permettant de produire les quatre spores haploïdes et recombinées (Figure 1.1). Chaque division de méiose est composée d'une prophase (condensation de la chromatine), d'une métaphase (alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale), d'une anaphase (séparation des chromosomes) et d'une télophase (décondensation).

Le terme recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR) regroupe les mécanismes de réparation de cassures double-brin de l'ADN par échanges de matériel génétique entre séquences homologues. Deux grands types d'événements sont distinguables : les crossovers (CO), qui sont des échanges réciproques d'ADN ; et les conversions géniques (*gene conversion*, GC), qui sont des échanges non réciproques. Les conversions géniques peuvent être ou non associées aux CO, et dans ce dernier cas on les appelle non-crossovers (NCO).

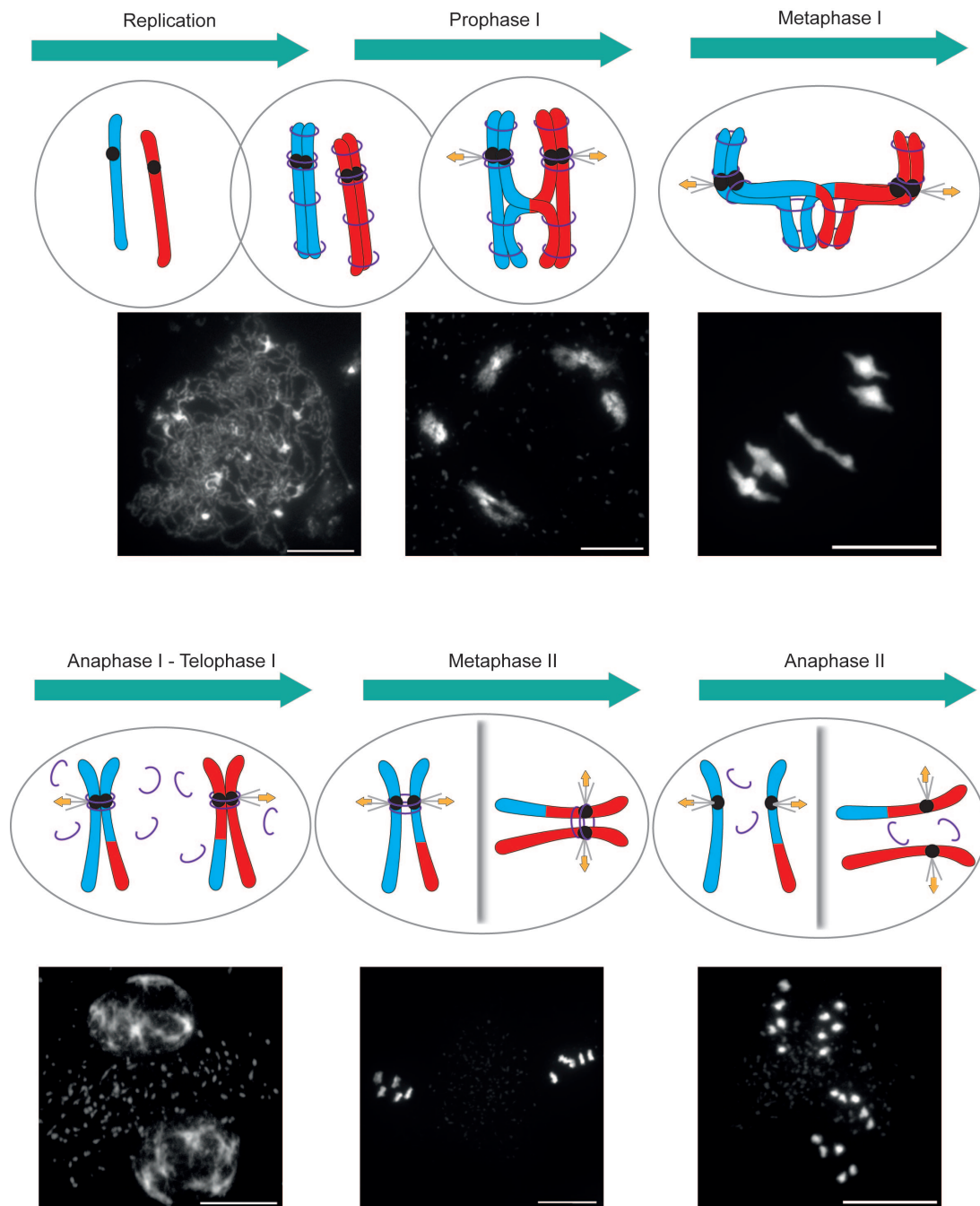


FIGURE 1.1 – La méiose est composée de deux divisions successives après un seul cycle de réplication. Les différentes étapes sont représentées schématiquement avec le comportement d'une paire de chromosomes homologues (rouge et bleu). Les cohésines sont représentées par des cercles violets encerclant les chromatides sœurs. L'étalement chromosomique (coloration DAPI) de méiocytes mâles d'*Arabidopsis* correspondant est montré en dessous. Barre d'échelle = $10\mu\text{m}$

1.1.1 Première division réductionnelle, seconde division équationnelle

Les chromosomes répliqués sont composés de deux chromatides identiques (aux erreurs de réplication près) jointes l'une à l'autre par les cohésines, mises en place au moment de la réplication (UHLMANN et al. 1998). Les cohésines sont un complexe protéique en forme d'anneau qui permet, selon le modèle dominant aujourd'hui, d'encercler les deux chromatides sœurs et de les maintenir ensemble (Figure 1.1 et Figure 1.4B, NASMYTH et al. 2009). En méiose, des cohésines spécifiques sont chargées sur la chromatine, et notamment REC8 chez *Arabidopsis* (NASMYTH et al. 2009).

Les deux division méiotiques sont fondamentalement différentes du point de vue du comportement des chromosome : la première division permet la séparation des chromosomes homologues alors que la deuxième permet la séparation des chromatides sœurs. Ces deux types d'événements impliquent donc des modifications importantes de la régulation de la ségrégation des chromosomes.

En méiose I, les kinétochores des deux chromatides sœurs sont orientés vers le même pôle de la cellule : ils sont mono-orientés (HAUF et al. 2004). Cette mono-orientation permet aux sœurs de migrer du même côté en première division (Figure 1.1). Chaque cellule fille reçoit, en fin de méiose I, un exemplaire de chaque chromosome homologue, c'est ce que l'on appelle la division réductionnelle. La cohésion centromérique est conservée lors de cette première division et permet aux deux chromatides sœurs de rester solidaires et de s'aligner correctement sur la plaque de métaphase II. Cette cohésion centromérique est protégée de la dégradation par les protéines SHUGOSHIN (KITAJIMA et al. 2004) ainsi que PATRONUS chez *Arabidopsis* (CROMER et al. 2013).

En deuxième division, les cohésines centromériques sont déprotégées, puis clivées, pour permettre la ségrégation des chromatides sœurs et la formation des 4 gamètes équilibrés (SAKUNO et al. 2009) : c'est la division équationnelle.

1.1.2 Importance de la recombinaison pour la fertilité

Le chiasma est une structure cytologique qui traduit la présence d'un événement de crossover. Le chiasma est révélé non seulement par l'échange réciproque de matériel génétique entre les deux chromosomes homologues, mais aussi par le fait que chacun de ces chromosomes sont tenus par les cohésines. Les deux chromatides engagées dans un crossover subissent un changement de continuité dû au crossover (passage rouge-bleu, Figure 1.1) et sont aussi liées par des anneaux de cohésion qui encerclent les chromatides sœurs. Ainsi, les crossovers permettent donc non seulement de brasser les allèles paren-

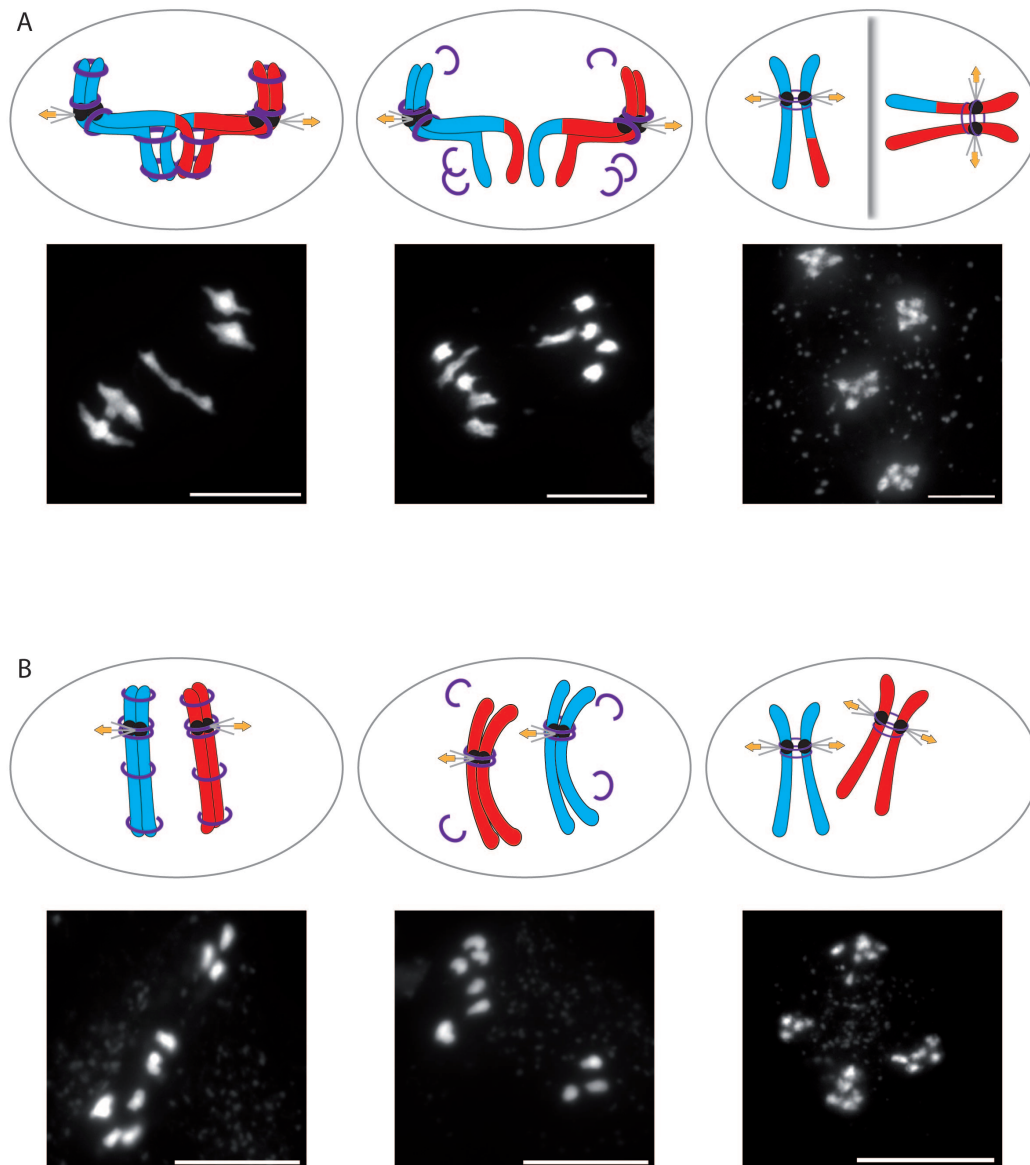


FIGURE 1.2 – Le chiasma est essentiel à la bonne disjonction des chromosomes homologues. Pour chaque stade représenté, l'étalement chromosomique (coloration DAPI) de méiocytes mâles d'*Arabidopsis thaliana* correspondant est montré au dessous. Barre d'échelle = 10 μ m. Les cohésines (en violet) sont mises en place lors de la réplication et maintiennent les chromatides sœurs ensemble. A) Chez le sauvage. Lorsque le crossover est formé, les chromatides sœurs subissent un changement de continuité (bleu-rouge). La cohésion permet de maintenir les deux homologues engagés dans un crossover, formant l'unité bivalent. Lors de l'anaphase, les cohésines des bras des chromosomes sont éliminées et les chromosomes homologues peuvent migrer vers les pôles opposés de la cellule. B) Chez un mutant *spo11*, qui ne présente aucun crossover, les chromosomes homologues ne sont plus engagés dans un bivalent mais sont libres et apparaissent comme des univalents. Ces univalents migrent de façon indépendante vers l'un ou l'autre des pôles de la cellule lors de l'anaphase.

taux, mais aussi d'assurer un lien entre les chromosomes homologues en méiose I. Lors de l'anaphase, cette cohésion est relâchée et les chromosomes homologues peuvent ségréger (KUDO et al. 2006).

La présence de chiasmas est une condition nécessaire à la bonne disjonction des chromosomes homologues en première division chez l'immense majorité des espèces. En effet, les chromosomes homologues qui ne sont pas liés par un chiasma ségrègent aléatoirement vers l'un ou l'autre pôle de la cellule, indépendamment l'un de l'autre. C'est le cas chez de nombreux mutants présentant un défaut de crossovers, comme le mutant *spo11* ou les mutants *zmm* (Figure 1.2B, voir aussi 2.3.1). Ces défauts de crossovers mènent à la formation de cellules avec des chromosomes manquants ou surnuméraires (cellules aneuploïdes), qui donnent généralement des gamètes non viables. Chez la Femme, 10 à 30% des ovocytes sont aneuploïdes, majoritairement à cause de problèmes de ségrégation en méiose I (non établissement du crossover ou disjonction prématurée, et dans certains cas, séparation des chromatides sœurs en première division) (TERRET et al. 2013).

Chez de rares espèces, la ségrégation des chromosomes homologues ne dépend pas de la formation de chiasmas. C'est le cas chez la drosophile mâle, chez plusieurs phalènes comme *Bombyx nori* (RASMUSSEN 1977) ou *Ephestia kuehniella* (TRAUT 1977) du côté femelle, chez la mante religieuse *Bolbe nigra* du côté mâle (GASSNER 1969), chez le plathelminthe *Mesostoma ehrenbergii* femelle (OAKLEY 1985). Les mécanismes de distribution des chromosomes lors des méioses achiasmatiques restent peu connus. Le chromosome 4 de la drosophile ne mesure que 5Mb et ne subit pas de CO lors de la méiose femelle, pourtant les deux chromosomes 4 ségrègent normalement dans 99% des méiose I, c'est ce que l'on appelle la ségrégation distributive (CARPENTER 1973). Il a été montré que cette ségrégation repose sur l'homologie de séquences hétérochromatiques (DERNBURG et al. 1996 ; HAWLEY et al. 1993). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la ségrégation distributive de chromosomes artificiels ou authentiques serait, elle aussi, basée sur l'homologie de séquence, par un mécanisme encore inconnu (DAWSON et al. 1986 ; GUACCI et al. 1991). Ces quelques contre-exemples montrent que la formation de CO est essentielle à la correcte ségrégation des chromosomes homologues en première division de méiose chez la quasi totalité des espèces.

1.2 La prophase de méiose

La prophase de première division de méiose (prophase I) est le siège de très nombreux événements cytologiques et moléculaires, qui se succèdent de façon contrôlée pour obtenir, en métaphase I, des chromosomes homologues engagés en bivalents.

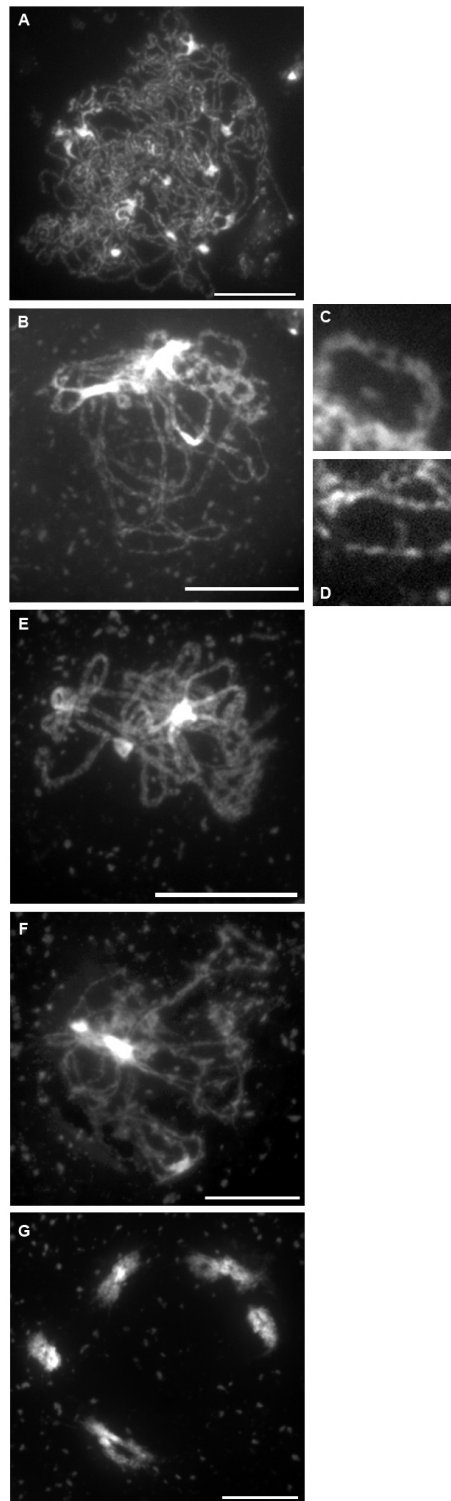


FIGURE 1.3 – Etalements chromosomiques de méiocytes mâles d'*Arabidopsis thaliana* coloré au DAPI. A : Leptotène. B : Zygotène. C : Agrandissement d'une zone synapsée du stade zygotène. D : Agrandissement d'une zone non synapsée du stade zygotène. E : Pachytène. F : Diplotène. G : Diacinèse. Barre d'échelle = 10 μ m

La prophase de première division est environ trois fois plus longue qu'une prophase mitotique chez *Arabidopsis* : sur 33 heures de méiose, 30 heures sont allouées à la prophase I (ARMSTRONG et al. 2003) contre 8.5h pour les divisions mitotiques de l'embryon (VAN'T HOF et al. 1978). La fin de la prophase correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire. La recombinaison s'étend tout au long de la prophase I, et se déroule donc dans l'espace clos qu'est le noyau. On divise classiquement la prophase en 5 stades (Figure 1.3) :

- **Le stade leptotène** (du grec *leptos* "mince, ténu" et *tenia* "ruban") où les chromosomes apparaissent en fils minces ;
- **Le stade zygotène** (du grec *zygo* "paire") où les chromosomes homologues s'appariaient progressivement sur leur longueur. Le synapsis se met graduellement en place ;
- **Le stade pachytène** (du grec *packys* "épais, gras") où le synapsis est complet et la chromatine apparaît cotonneuse ;
- **Le stade diplotène** (du grec *diplo* "double") où le complexe synaptonémal se dissocie. Les chromosomes homologues ne sont plus rattachés que par les chiasmas, qui sont la manifestation cytologique des crossovers ;
- **Le stade diacynèse** (du grec *dia* "à travers, par" et *kinesis* "mouvement") où les chromosomes se condensent progressivement et où apparaissent plus distinctement les chiasmas.

1.2.1 Mise en place des axes chromosomiques

Les premières observations en microscopie électronique des chromosomes en prophase de méiose furent une avancée majeure pour les cytologistes (MOSES 2006).

Lors de la réplication, les cohésines (et notamment REC8) sont mises en place (ci dessus). D'autres protéines, nommées condensines, sont aussi chargées sur la chromatine en prophase et participent, avec les cohésines, à l'organisation de la chromatine (WOOD et al. 2010). Notamment, une condensation de la chromatine est observable par l'apparition de boucles d'ADN qui s'échappent des complexes cohésines et condensines (Figure 1.4B). Très tôt en prophase I, les axes chromosomiques sont mis en place (*axial element*, AE) : ces axes sont formés des cohésines et des condensines, plus des protéines axiales spécifiques (qui seront évoquées dans le chapitre suivant). Les deux chromatides sœurs, empilées l'une sur l'autre, forment des boucles dans le plan perpendiculaire à cet axe latéral. Cette organisation en boucle est étonnamment bien conservée bien que la taille des boucles d'ADN varie énormément : dans les oocytes de souris, ces boucles mesurent environ $3\mu\text{m}$ de long, chacune contenant 120 kilobases (MOENS et al. 1988) ; alors que la levure présente des boucles de $0,2\text{-}0,6\mu\text{m}$ contenant 20kb d'ADN (BORDE et al. 2013 ; KLECKNER 2006).

Le complexe synaptonémal (*synaptonemal complex*, SC) est une structure protéique

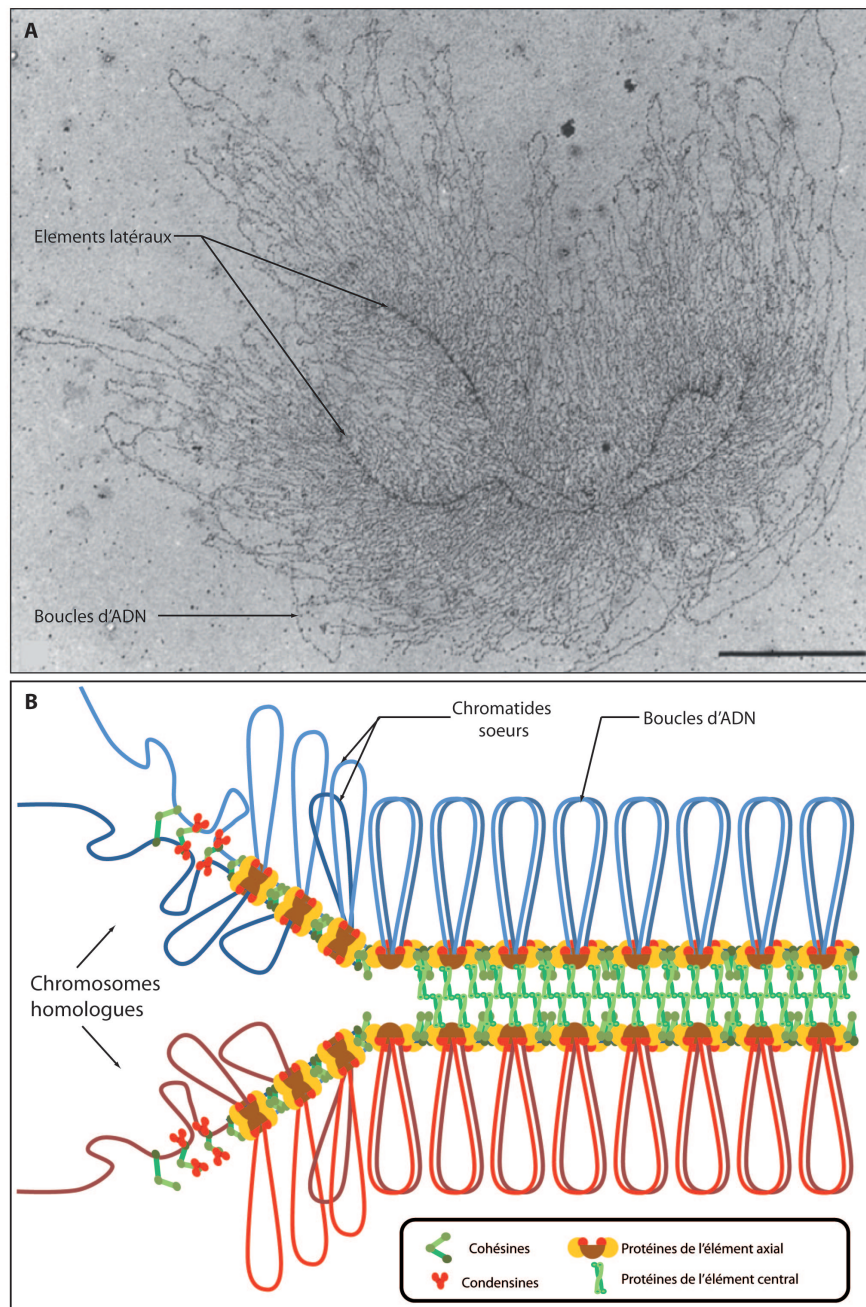


FIGURE 1.4 – **Organisation de la chromatine autour des axes et du complexe synaptonémal.** A) Chromosome de la pirale de la farine *Ephesia kuehniella* en pachytène en microscopie électronique, les deux axes étant un peu dissociés. Barre d'échelle = $5\mu\text{m}$ (WEITH et al. 1980). B) Modèle d'organisation de la chromatine en boucle autour des axes et du complexe synaptonémal. Réalisation : N.Macaisne

qui va venir ponter les deux axes chromosomiques, pour associer les chromosomes homologues sur toute leur longueur (Figure 1.4A). Le SC est une structure extrêmement bien conservée chez les eucaryotes, à l'exception de quelques contre-exemples comme *Schizosaccharomyces pombe* et *Aspergillus nidulans* (ZICKLER et al. 1999). La mise en place de l'élément central (*central element*, CE), aussi appelé synapsis, sera développée ci-dessous (1.2.3).

1.2.2 Formation du bouquet et alignement pré-synaptique

Comme l'a suggéré Barbara McClintock en 1933, "les chromosomes ont tendance à s'associer deux par deux en prophase de méiose" (ZICKLER 2006). L'association des chromosomes homologues culmine par la mise en place du SC, mais commence tout d'abord par un simple appariement. Avant la mise en place du SC, les chromosomes homologues s'alignent sur leur longueur. L'initiation de cet appariement se fait par un mécanisme encore mal connu.

Le bouquet est une structure conservée qui favoriserait l'alignement des chromosomes avant tout événement de synapsis chez de nombreuses espèces. Au début du stade zygotène, les chromosomes s'attachent à l'enveloppe nucléaire via leurs télomères et s'amassent ensuite en grappe pour former une structure qui ressemble à un bouquet de fleurs. Le bouquet a été observé chez toutes les espèces, du maïs aux levures, en passant par la drosophile et le nématode (HARPER 2004). Le bouquet peut être très important pour le bon déroulement de la méiose chez certaines espèces, notamment chez *S.pombe* qui ne possède pas de complexe synaptonémal. Chez cette espèce, les chromosomes forment un bouquet très dense et fermé, puis le noyau est ensuite remué dans la cellule, comme dans une machine à laver (CHIKASHIGE et al. 1994). A l'inverse, chez *Arabidopsis*, le bouquet est très transitoire et relâché (ROBERTS et al. 2009). Il est proposé que le bouquet pourrait non seulement promouvoir le synapsis, en permettant l'appariement des chromosomes, mais aussi de restreindre la recherche d'homologie en alignant les chromosomes de façon colinéaire, limitant la recherche à deux dimensions au lieu de trois. Le bouquet et le mouvement des chromosomes auraient aussi un rôle dans la résolution des nœuds entre chromosomes (*interlocks*) (ZICKLER et al. 1999). Les mutants affectés dans la formation du bouquet ne présentent pas de phénotype drastique ni chez la levure ni chez le maïs : si le synapsis est affecté il n'est en aucun cas annulé, comme l'indique l'étude des mutants *ndj* et *pam1* respectivement (HARPER 2004). L'attachement des télomères sur l'enveloppe nucléaire dépend de protéines insérées dans les deux membranes nucléaires : les protéines SUN et KASH (HIRAOKA et al. 2009). Chez la souris, la délétion de la protéine SUN1 induit une stérilité mâle et femelle due au mauvais attachement des télomères et à un

défaut de synapsis (DING et al. 2007 ; LEI et al. 2009). Chez *Caenorhabditis elegans*, la perte de SUN1 induit des aberrations de synapsis qui se fait alors entre chromosomes non-homologues (PENKNER et al. 2009 ; SATO et al. 2009).

Toutes ces données montrent que, si le bouquet semble être présent chez une grande majorité des espèces, l'importance du bouquet pour le synapsis et la recombinaison est plus ou moins important suivant les espèces.

1.2.3 Mise en place du complexe synaptonémal

Le complexe synaptonémal est une structure extrêmement bien conservée, et a été découvert par Montrose J. Moses en 1956 sur des photographies de microscopie électronique de chromosomes d'écrevisse (MOSES 1956) et de salamandre (MOSES 1958). Il écrit alors :

Un complexe linéaire constitué de trois bandes parallèles a été observé au niveau de l'axe central des chromosomes des spermatocytes. (...) Le terme *complexe synaptonémal* est proposé pour décrire cette structure. (...) Dans les stades décrits, les chromosomes homologues ne sont pas toujours complètement appariés. L'axe latéral suit le long de chaque chromosome homologue dans ces cas là. L'élément central apparaît et disparaît, et devrait donc correspondre au phénomène d'appariement des chromosomes au cours de la méiose.

Dans cette citation, l'auteur utilise le mot appariement pour décrire le phénomène de synapsis. Je réserve ici l'emploi du mot appariement pour décrire les associations de chromosomes homologues indépendamment du phénomène de synapsis.

On sait aujourd'hui que le SC est effectivement composé d'une structure tripartite avec un élément central reliant les axes latéraux des deux chromosomes homologues (Figure 1.4B et Figure 1.5). En se basant sur ce qui se passe chez *Arabidopsis*, cet élément axial peut-être par exemple visualisé par l'immunolocalisation des protéines REC8 ou ASY1, qui sont des composants de cet axe chromosomique. La Figure 1.5 donne un aperçu du signal ASY1 au cours de la prophase de méiose chez *Arabidopsis*. Le signal ASY1 apparaît très précocement en prophase le long de chromosomes. Le signal est alors intense, puis devient plus diffus autour de la chromatine au cours de la progression de la prophase.

Au stade zygotène, l'élément central se met en place à partir de plusieurs sites de nucléation puis s'étend de manière bidirectionnelle pour associer les chromosomes homologues : c'est le synapsis. Chez *Arabidopsis*, la progression du synapsis peut être suivie par immunolocalisation de la protéine ZYP1 (qui est une des protéines de l'élément central, en vert sur la Figure 1.5). Le synapsis est complet au stade pachytène, puis se désagrège. Au stade diacinèse, les chromosomes homologues ne sont plus associés que par les chiasmata.

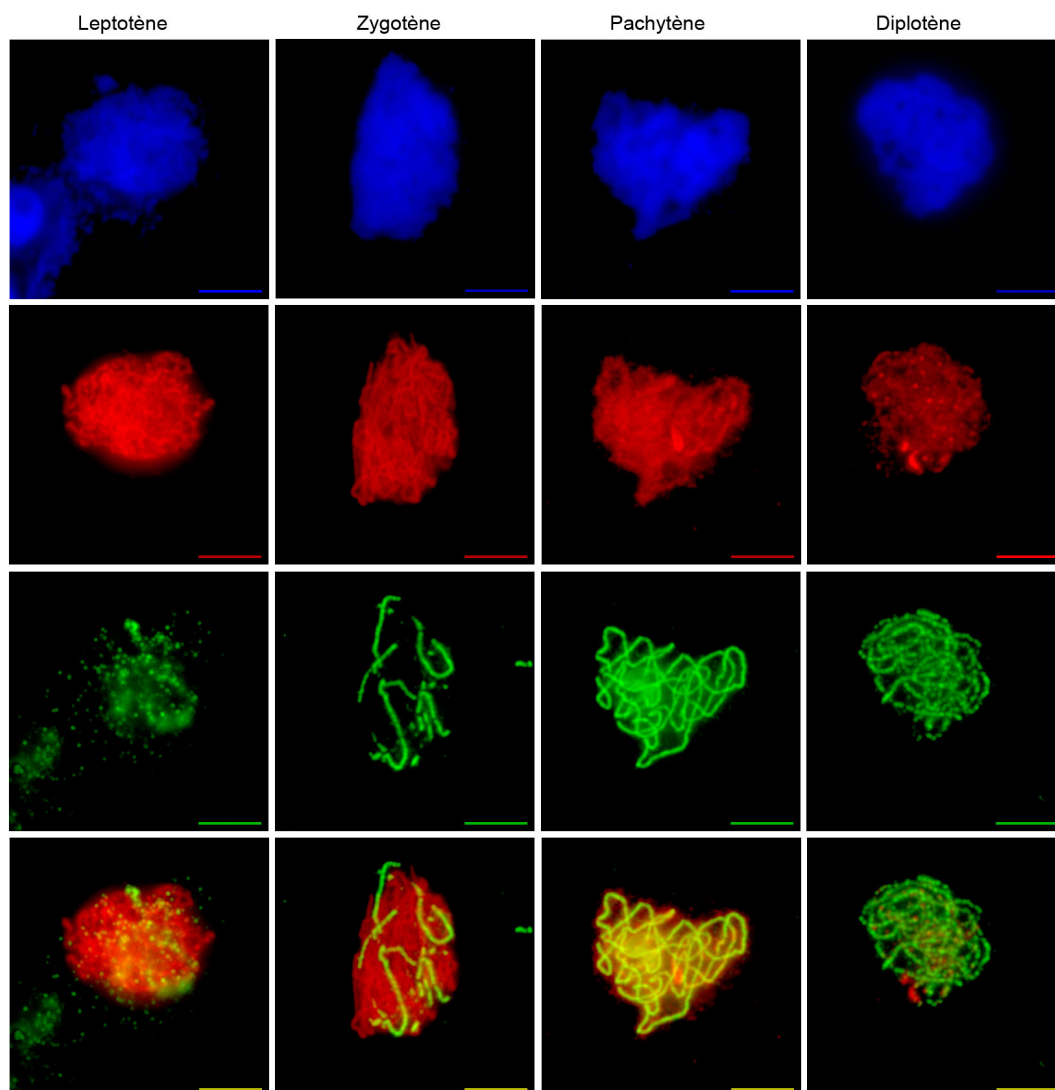


FIGURE 1.5 – Mise en place du complexe synaptonémal chez *Arabidopsis thaliana*. Etalements chromosomiques de méiocytes mâles avec immunolocalisation des protéines ASY1 (élément de l'axe chromosomique, en rouge) et ZYP1 (protéine de l'élément central, en vert) sur la chromatine (coloration DAPI, en bleu). La dernière ligne présente une juxtaposition des signaux verts et rouges. En leptotène, les axes latéraux sont en place. Au stade zygotène, il y a apparition du signal vert ZYP1 qui marque l'initiation du synapsis. Remarquez comme les deux marquages semblent exclusifs. En pachytène, le synapsis est complet, le signal vert couvre entièrement la chromatine. Dès le leptotène, le signal s'affaiblit et le SC se désagrège : présente un profil ponctué. Données personnelles, Liudmila Chelysheva.

1.2.4 Recombinaison et cytologie

1.2.4.1 SC et recombinaison

Chez de nombreuses espèces, les liens entre SC et recombinaison sont étroits : le SC est important pour la recombinaison, et à l'inverse la recombinaison peut aussi être nécessaire pour le synapsis. En effet, les défauts de synapsis entraînent des défauts de recombinaison : les mutants des protéines de l'AE et du CE présentent des défauts de recombinaison chez *Arabidopsis* (ARMSTRONG 2002 ; HIGGINS et al. 2005), comme chez la levure (HOLLINGSWORTH et al. 1989 ; SYM et al. 1993) ou la souris (WOJTASZ et al. 2009). A l'inverse, des défauts d'initiation de la recombinaison (cassures, résection, invasion simple brin, voir Chapitre 2) entraînent des défauts de synapsis chez *Arabidopsis* (COUTEAU et al. 1999 ; GRELON et al. 2001 ; LI et al. 2004 ; STACEY et al. 2006) comme chez la souris (PITTMAN et al. 1998 ; ROMANIENKO et al. 2000 ; YOSHIDA et al. 1998) et chez la levure (ALANI et al. 1990 ; BISHOP et al. 1992). Chez certaines espèces cependant, comme *Drosophila melanogaster* ou *C.elegans*, le synapsis se met en place indépendamment de la formation des cassures double-brin (DERNBURG et al. 1998 ; MCKIM et al. 1998).

1.2.4.2 Progression de la prophase et de la recombinaison

D'un point de vue cytologique (qui est le point de vue adopté pour ce chapitre), il est possible de suivre la progression des étapes de la recombinaison au cours de la prophase. Ces étapes seront abordées plus en détail au cours du chapitre suivant, et seule leur manifestation cytologique ne seront décrites ici.

La recombinaison homologue méiotique commence par la formation de cassures doubles-brins de l'ADN (*double-strand break*, DSB ; voir 2.1). Ces cassures sont ensuite prises en charge par la machinerie de recombinaison, et notamment par DMC1 et RAD51 en méiose. L'anticorps DMC1 permet de visualiser les cassures à partir du stade leptotène (Figure 1.6) : on compte en moyenne 220-240 foyers DMC1 par cellules chez *Arabidopsis* , qui révèlent autant de cassures doubles-brins (CHELYSHEVA et al. 2007 ; CRISMANI et al. 2012 ; MACAISNE et al. 2008). Chez la souris, 150 foyers DMC1 sont détectables (TARSOUNAS et al. 1999), près de 50 foyers chez *S.cerevisiae* (BISHOP 1994). Chez *C.elegans* il semblerait que seule une douzaine de foyers soient observables sur les 6 paires de chromosomes (YOUNDS et al. 2010). Ces foyers permettent de rendre compte du nombre d'intermédiaires de recombinaison potentiels formés par cellule.

Ces intermédiaires ne donneront pas tous des CO. Il existe de nombreux marqueurs cytologiques indiquant le nombre et la position de CO, comme la protéine MLH1, aussi bien chez *Arabidopsis* que chez la tomate et la souris (ANDERSON et al. 1999 ; CHELY-

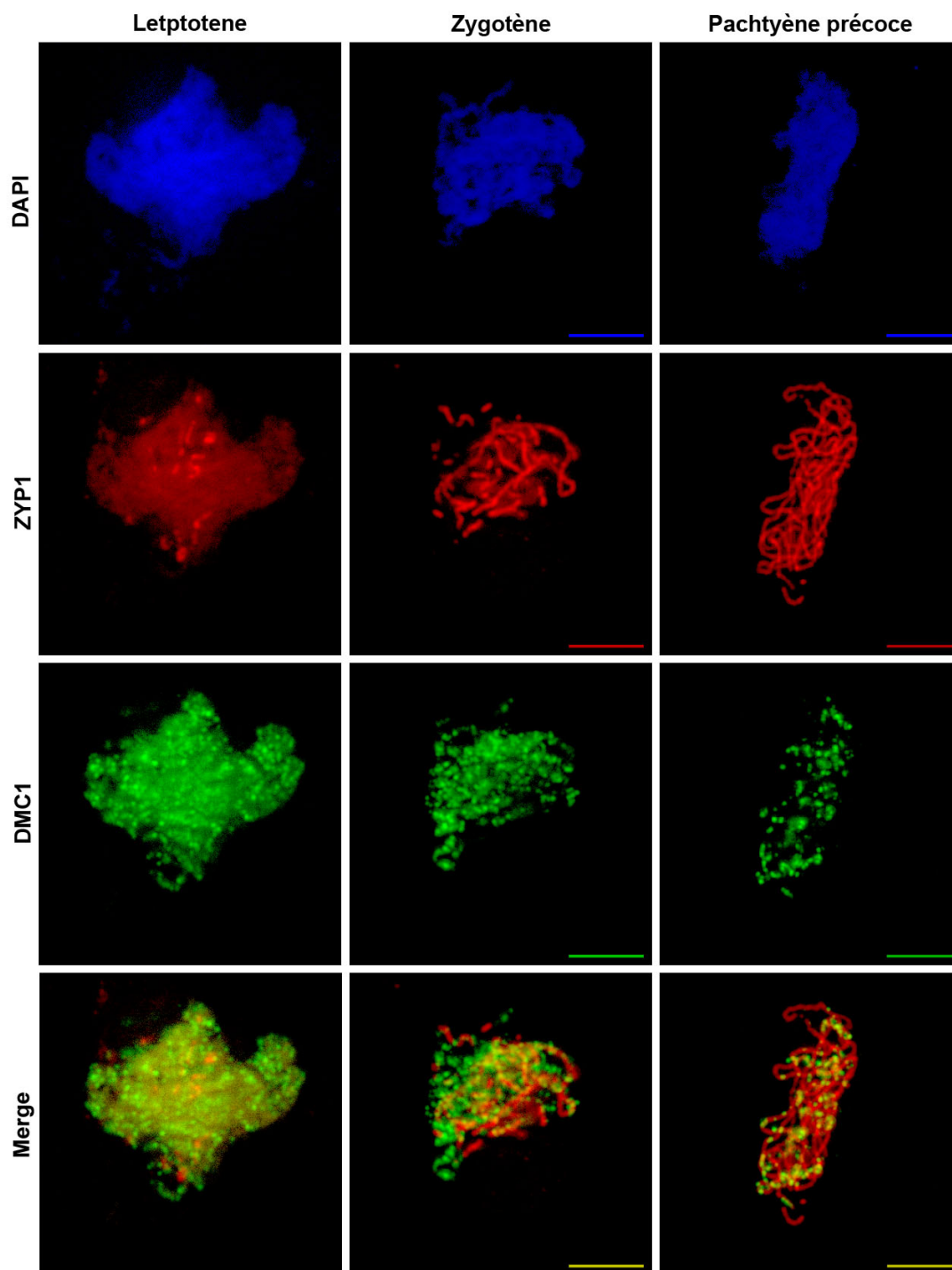


FIGURE 1.6 – Localisation de la protéine DMC1 comme un marqueur des DSB. Les foyers DMC1 (en vert) apparaissent au stade leptotène quand les chromosomes ne sont pas encore synapsés (ZYP1 en rouge) et persistent jusqu'en pachytène où ils finissent par disparaître. Données personnelles, Liudmila Chelysheva (CHELYSHEVA et al. 2007).

SHEVA et al. 2007 ; LHUISSIER et al. 2007). Illustrant le fait que tous les intermédiaires de recombinaison ne donneront pas des CO, le nombre de foyers MLH1, bien que ne marquant pas la totalité des CO, est bien inférieur au nombre de foyers DMC1 chez un grand nombre d'espèces : *Arabidopsis* présente une dizaine de foyers MLH1 par cellule (pour 5 paires de chromosomes, CHELYSHEVA et al. 2007), un peu plus de vingt chez la souris (pour 20 paires de chromosomes, ANDERSON et al. 1999) et une quinzaine chez la tomate (pour 12 paires de chromosomes, LHUISSIER et al. 2007). Un marquage équivalent chez *C.elegans* avec l'immunolocalisation de la protéine COSA-1 révèle 6 foyers pour 6 paires de chromosomes (YOKOO et al. 2012).

Pour rendre compte de la dynamique de formation des CO à partir de ces nombreux intermédiaires, il est possible de suivre la dynamique de formation des foyers HEI10 chez *Arabidopsis* (Figure 1.7) et chez *Sordaria macrospora* (DE MUYT et al. 2014), comme chez la souris (REYNOLDS et al. 2013).

La dynamique du signal HEI10 est très similaire chez *Arabidopsis* et chez *Sordaria* (CHELYSHEVA et al. 2012 ; DE MUYT et al. 2014). Au stade leptotène, de nombreux foyers HEI10 peu brillants apparaissent (Figure 1.7A). Lorsque le SC se met en place (suivi par la progression du signal ASY1, en rouge, qui devient plus flou sur les parties synapsées), des foyers plus gros et plus brillants se mettent en place, uniquement sur les régions synapsées. En début de pachytène, les deux types de foyers coexistent encore, puis le nombre de foyers diminue drastiquement pour ne garder que les gros foyers brillants. Ces foyers persistent en diacinèse où ils colocalisent avec MLH1. Une dynamique similaire a été mise en évidence chez *Sordaria* et la souris (DE MUYT et al. 2014 ; REYNOLDS et al. 2013).

L'ensemble de ces données cytologiques montre qu'à partir d'un grand nombre d'intermédiaires de recombinaison seule une fraction sera désignée pour donner des crossovers. Les mécanismes de formation et de limitation de ces CO seront abordés dans les chapitres suivants.

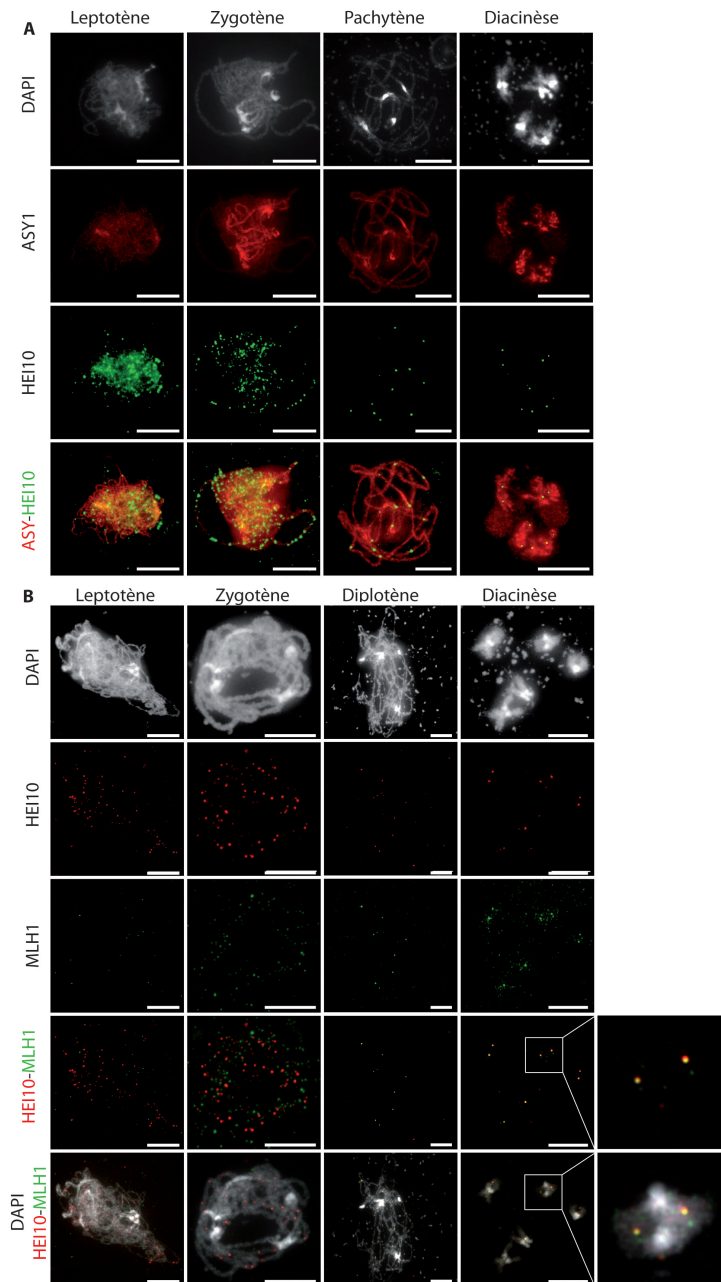


FIGURE 1.7 – **Immunolocalisation des protéines HEI10 et MLH1** au cours de la prophase de méiose. A) Progression de la formation des foyers HEI10 au cours de la mise en place du synapsis, marqué par la protéine ASY1 dont le signal devient flou sur les segments chromosomiques synapsés. B) Comparaison des dynamiques de formation des foyers HEI10 et MLH1. En diacinèse, les deux types de foyers colocalisent aux sites de crossovers (agrandissements). Données personnelles, Liudmila Chelysheva (CHELYSHEVA et al. 2012).

Description moléculaire de la recombinaison méiotique

La formation des crossovers dépend de la machinerie de la recombinaison homologue (HR). La HR est le mode de réparation principal des DSB en méiose, au détriment de la réparation par ligation de type NHEJ (*Non-Homologous End Joining*, jonction d'extrémités non-homologues) (CHAPMAN et al. 2012; KASS et al. 2010). Les mécanismes moléculaires de la HR seront développés au cours de ce chapitre. Tout commence par la formation des DSB, suivi de leur maturation (page 24). Suite à cette maturation, un des brins lésés envahit l'ADN d'une chromatide homologue (c'est l'invasion simple brin, page 31), pour former la D-loop. Cet intermédiaire est un carrefour de la HR et peut être pris en charge par différentes voies pour former des crossovers (CO, page 40), ou des non-crossovers (NCO, page 47). La régulation de la formation des CO sera abordée dans le chapitre suivant.

2.1 Formation et maturation des cassures double brin

Les cassures de l'ADN peuvent survenir à tout moment de la vie d'une cellule, suite à des dommages intrinsèques au métabolisme de la cellule (réplication, stress oxydatif, ...) ou à l'exposition à d'agents biotiques et abiotiques (agents mutagènes, rayonnements, virus, ...). En méiose, les cassures sont spécifiquement induites de façon contrôlée, et sont indispensables à la formation des crossovers.

2.1.1 SPO11 et les protéines partenaires

Les cassures double brin sont catalysées en méiose par la protéine SPO11, qui est très largement conservée chez les eucaryotes et peut être même considérée comme une protéine méiotique universelle (KEENEY 2008). SPO11 possède un domaine topoisomérase, homologue à celui de la topoisomérase VI A (BERGERAT et al. 1997; KEENEY et al. 1997). Les topoisomérases sont des enzymes capables de couper et religuer l'ADN, impliquées dans la résolution des nœuds formés par l'enchevêtrement des chromosomes lors de la réplication,

la transcription, etc. Les topoisomérases VI sont capables de faire des coupures double-brin de l'ADN, puis de catalyser la religation. SPO11 catalyse une coupure double-brin mais n'a pas la capacité de religuer les brins coupés (MASSY 2013).

En dehors de SPO11, de nombreuses protéines accessoires nécessaires pour former les cassures *in vivo* ont été décrites chez *S.cerevisiae*. SKI8 forme un sous-complexe avec SPO11 et est nécessaire à sa localisation (ARORA et al. 2004). Un second complexe formé avec REC102 et REC104 est localisé sur la chromatine et est nécessaire à la dimérisation de SPO11 (KEENEY 2001). Un troisième complexe nommé RMM, pour REC114-MEI4-MER2, est aussi crucial pour la formation des DSB. Chargé très précocement en prophase I, il disparaît après la formation des DSB (MASSY 2013).

Si SPO11 est extrêmement bien conservée, les protéines accessoires le sont moins. La mutation des homologues de SKI8 chez *S.pombe* (EVANS et al. 1997) et *Sordaria macrospora* (TESSÉ et al. 2003) mène à des phénotypes similaires à *spo11*, indiquant que sa fonction semble conservée chez ces espèces, mais pas chez les plantes où le mutant ne présente pas de phénotype méiotique (JOLIVET et al. 2006). Chez la souris, le rôle de l'homologue WDR61 n'a pas été testé en méiose (MASSY 2013). REC102, REC104 et MER2 ne semblent pas conservées en dehors de *S.cerevisiae*; REC114 est conservée chez la souris mais n'a pas été testé pour son rôle méiotique, chez les plantes, l'homologue PHS1 n'est pas impliquée dans la formation des DSB chez les plantes (PAWLOWSKI 2004; RONCERET et al. 2009). D'autres partenaires essentiels à la formation des DSB ont été découverts spécifiquement chez d'autres espèces, comme DSB-1 et DSB-2 chez *C.elegans* (ROSU et al. 2013; STAMPER et al. 2013); PRD1, PRD2 (proche de MEI4), PRD3 et DFO chez *Arabidopsis thaliana* (DE MUYT et al. 2009; ZHANG et al. 2012) ou MEI-P22 et TREM chez *D.melanogaster* (LAKE et al. 2011; LIU et al. 2002).

Cette variabilité des protéines accessoires laisse penser que les mécanismes de régulation de la formation des cassures sont différents chez les différents organismes.

2.1.2 Régulation de la formation des cassures double brin

2.1.2.1 Modèle de formation des cassures double-brin

L'organisation de la chromatine en boucle autour des axes chromosomiques impose une coordination entre les différents événements et les différents partenaires. Des études ont montré que les cassures sont formées sur les boucles, alors que SPO11 colocalise avec REC8, une cohésine de l'axe (KUGOU et al. 2009) avec nombre de ses partenaires (BLAT et al. 2002; KUMAR et al. 2010; PANIZZA et al. 2011). Le modèle émergent est que les séquences subissant la cassure, situées sur une boucle, sont entraînées vers

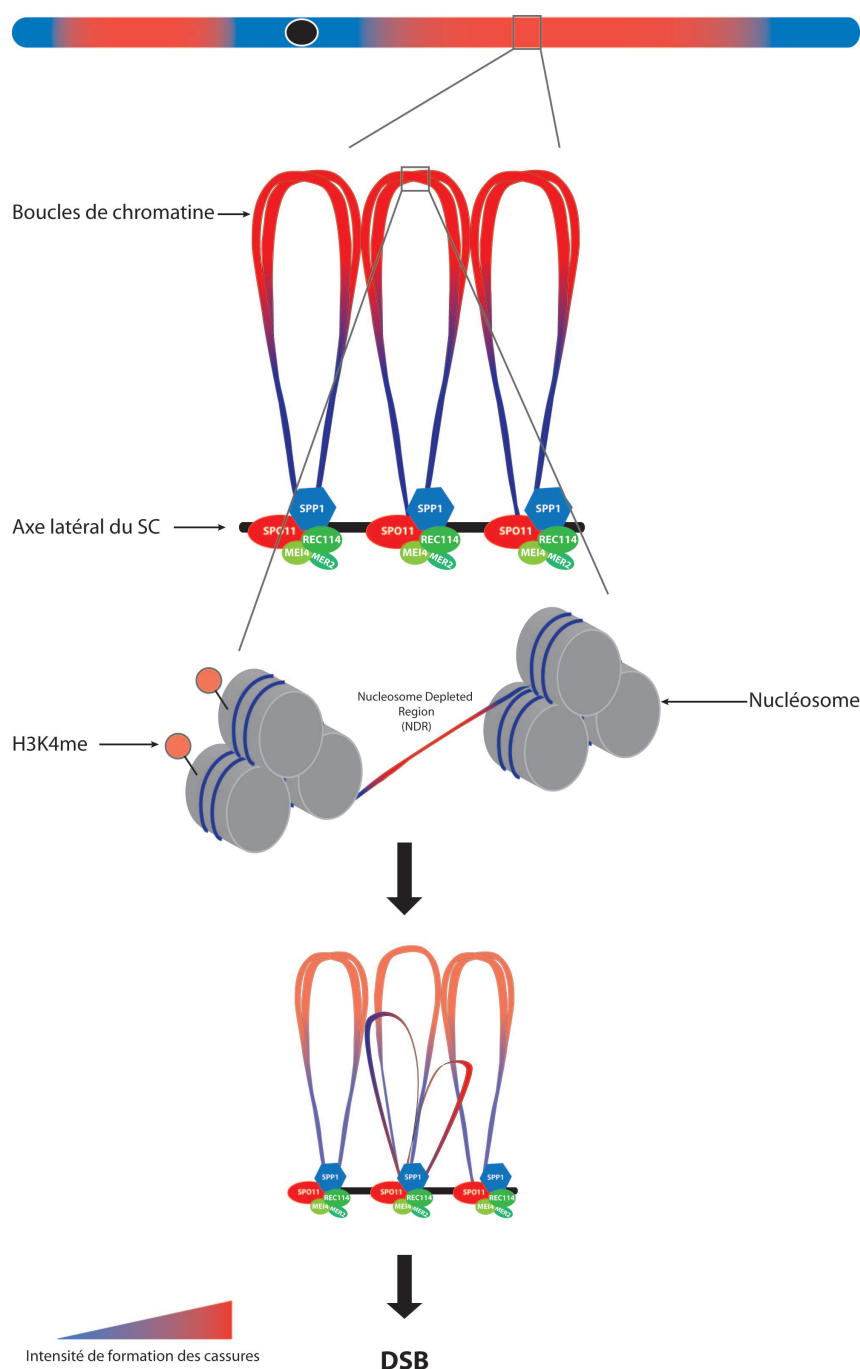


FIGURE 2.1 – **L'intensité de formation des cassures doubles-brins n'est pas uniforme** suivant les régions du génome, la position par rapport à l'axe du SC et la position des nucléosomes chez *S.cerevisiae*. Les protéines RMM nécessaires à l'activité de SPO11 sont situées sur l'axe (REC114, MEI4, MER2). SPP1 est aussi située sur l'axe et est impliquée dans le recrutement des séquences sur les boucles vers l'axe pour faire la cassure. Les marques épigénétiques de type H3K4me2 et H3K4me3 sont essentielles à son action. C'est dans le contexte de l'axe qu'a lieu la formation des DSB. Adapté de PAN et al. 2011 et BORDE et al. 2013.

l'axe via des interactions protéines-protéines pour procéder à la cassure (modèle *tethered axis-loop*, Figure 2.1). Chez *S.cerevisiae*, SPP1 a notamment été montrée comme étant essentielle dans ce processus en interagissant spécifiquement avec des marques de l'ADN au niveau des cassures et avec MER2 sur l'axe chromosomique (ACQUAVIVA et al. 2013; SOMMERMEYER et al. 2013).

2.1.2.2 Positions des cassures double-brin dans le génome

La formation des DSB est hautement régulée. Le niveau de cassures et la position de ces cassures sont contrôlés, mais les mécanismes de régulation ne sont pas toujours bien élucidés chez toutes les espèces, et semblent varier d'une espèce à l'autre.

La distribution des événements de crossovers par mégabase de génome n'est pas uniforme : elle varie entre les espèces, et au sein d'une même espèce elle varie entre les chromosomes et le long des chromosomes (JENSEN-SEAMAN 2004). Il existe des régions froides et des régions chaudes, ainsi que des loci plus restreints de forte densité en cassures et en événement de recombinaison : les hotspots. L'anisotropie de distribution des événements de cassures et de CO est particulièrement frappante chez le maïs. La fréquence de recombinaison peut varier d'un facteur 1 à 100 entre différentes régions du génome, en allant de 0.06cM/Mb à 8.47cM/Mb (FARKHARI et al. 2011). Les régions chaudes sont des régions subtélomériques, tandis que les régions froides sont centromériques ou proches des *knobs* (régions hautement répétées et hétérochromatiques). Ce profil de distribution se retrouve chez un grand nombre d'organismes, comme le concombre (LOU et al. 2013), la tomate (SIM et al. 2012) et *A.thaliana* (GIRAUT et al. 2011) et probablement chez *S.cerevisiae* (MANCERA et al. 2008). Chez l'homme, la fréquence de recombinaison varie de 0 à 5cM/Mb (KONG et al. 2002).

Les premières évidences de points chauds (*hotspots*) de cassure et de recombinaison sont venues de la levure *S.cerevisiae*. Ils sont alors définis comme de courtes de régions de 1 à 2 kb présentant une fréquence accrue de CO et de NCO (LICHTEN et al. 1995). Cette observation s'est étendue aux autres eucaryotes. Par exemple un fragment de 3,5 kb du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de la souris contient un CO dans 0,6% des méioses, ce qui représente une fréquence (rapportée à la taille physique) 300 fois supérieure à la moyenne du génome (UEMATSU et al. 1986). Chez *Arabidopsis thaliana*, deux hotspots de quelques kb bien étudiés présentent une fréquence accrue de 20 à 30 fois la moyenne du chromosome 4 sur lequel ils sont situés, avec un CO dans 0.5% des méioses (DROUAUD et al. 2013). Un des hotspot les plus chauds a été décrit chez la souris avec 1% de recombinaison dans 210pb (GUILLON et al. 2002).

Les caractéristiques des points chauds ne sont pas bien connues, mais quelques pistes

peuvent néanmoins être suggérées. Les mécanismes de désignation des hotspots de cassures, bien qu'ils semblent différents d'une espèce à l'autre, semblent converger vers un thème commun : les modifications de la chromatine. On retrouve chez toutes les espèces, des marques de chromatine ouverte là où sont localisées les hotspots de DSB : méthylation des histones, variant d'histones et position des nucléosome semblent être les principaux régulateurs du positionnement des cassures (BAUDAT et al. 2013 ; BORDE et al. 2013 ; CHOI et al. 2013).

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), marque présente en 5' des gènes, est importante pour la localisation des DSB chez *C.elegans* (REDDY et al. 2004), chez *Arabidopsis* (CHOI et al. 2013) et chez *S.cerevisiae* (BORDE et al. 2009). Chez la levure, SPP1 lit d'ailleurs cette marque via son domaine PHD pour recruter les séquences sur les boucles vers l'axe et procéder à la cassure (ACQUAVIVA et al. 2013 ; SOMMERMEYER et al. 2013). L'emplacement des nucléosomes (les octamères d'histones structurant la chromatine) régule aussi la formation des DSB : ainsi les cassures se forment préférentiellement, chez *S.cerevisiae*, *S.pombe* et *Arabidopsis*, dans les régions dépourvues de nucléosomes (NDR, *nucleosome depleted regions*, ou LND *low nucleosome density*) comme par exemple les sites de départs de transcription des gènes ou leurs terminateurs (CHOI et al. 2013 ; MASSY 2013).

Chez les mammifères, un déterminant majeur des sites de hotspots est une séquence consensus reconnue par la méthyltransférase PRDM9 (BAUDAT et al. 2010 ; MYERS et al. 2010 ; PARVANOV et al. 2010). Une fois recrutée, PRDM9 qui pourrait alors méthyler H3K4 et favoriser la formation des cassures (BUARD et al. 2009 ; GREY et al. 2011). PRDM9 est un déterminant très fort pour établir les hotspots de cassures : Grey et ses collègues ont montré qu'en changeant le motif de reconnaissance de l'ADN de PRDM9 (le doigt de Zinc), les hotspots de cassures étaient délocalisés, les profils de méthylation H3K4me3 étaient perturbés et la distribution des CO affectée (GREY et al. 2011).

Ces données montrent que si SPO11 est extrêmement bien conservée, la régulation de la formation des cassures a évolué différemment chez les différentes espèces, en recrutant des acteurs et des marques épigénétiques différents.

2.1.2.3 Régulation du niveau de cassures double-brin

Le niveau de cassures double-brin est aussi soumis à des régulations. La fenêtre de formation des cassures est assez courte et les mécanismes de régulation sont encore peu connus (KEENEY et al. 2006). Une interdépendance entre la mise en place du SC et la formation des DSB a été mise en évidence chez la souris (KAUPPI et al. 2013) : (i) la mise en place du SC est concomitante (dans l'espace et dans le temps) avec la disparition

des cassures ; (ii) dans un mutant hypomorphe de *SPO11*, les régions non synapsées du chromosome X continuent à accumuler des cassures. Tout se passe donc comme si le synapsis était un signal pour arrêter de former les cassures. Il est probable que la mise en place du SC agisse comme un point de contrôle régulant la formation et la réparation des DSB.

Toutes les protéines de l'axe sont nécessaires à la formation d'un niveau normal de cassures (KIM et al. 2010). De plus, la mutation des condensines, qui sont importantes pour la compaction de l'ADN et la mise en place de l'axe, entraîne une augmentation de la longueur du SC et une augmentation du nombre de cassures chez *C.elegans* (METS et al. 2009). L'assemblage correct des axes chromosomiques semble donc réguler le niveau de formation des DSB.

Des boucles de rétrocontrôle semblent aussi exister : le manque d'intermédiaires de recombinaison semblerait jouer sur le niveau de formation des cassures. Chez *C.elegans*, DSB-2 est un régulateur de la formation des DSB et dans les fonds mutants présentant des défauts de DSB (*him-17*), DSB-2 persiste plus longtemps sur la chromatine comme si la cellule répondait au manque d'intermédiaires de recombinaison en prolongeant la phase de formation des cassures (ROSU et al. 2013). Chez la souris, les mutants *zmm*, qui présentent un défaut de formation de CO, présentent un niveau élevé de cassures, ce qui peut être interprété comme une réponse de la cellule à un manque d'intermédiaires de recombinaison (THACKER et al. 2014). De la même façon, chez *Arabidopsis*, le mutant *zmm zip4* présente une augmentation du nombre de foyers DMC1 par rapport au sauvage. Les auteurs ont interprété ce résultat comme le signe d'un défaut dans la dynamique de prise en charge de ces cassures, mais il se pourrait que la persistance des foyers DMC1 soit le signe d'une prolongation de la phase de formation des cassures (CHELYSHEVA et al. 2007). Une autre boucle de rétrocontrôle est assurée par la kinase ATM : la formation des cassures permet de recruter le complexe MRN de résection (cf. ci-dessous) qui active ATM, qui lui-même régule négativement la formation des cassures (LANGE et al. 2011).

Ces données mènent à la conclusion que de nombreuses boucles de contrôle et de rétrocontrôle existent pour ajuster le nombre de cassures doubles-brins en prophase de méiose.

2.1.3 Maturation des cassures doubles-brins

Après la formation des DSB, les brins d'ADN sont digérés de chaque côté afin de libérer des extrémités 3' flanquantes qui pourront servir d'amorces pour la synthèse d'ADN dans les étapes suivantes (Figure 2.2). Cette résection des brins clivés se fait grâce à l'action

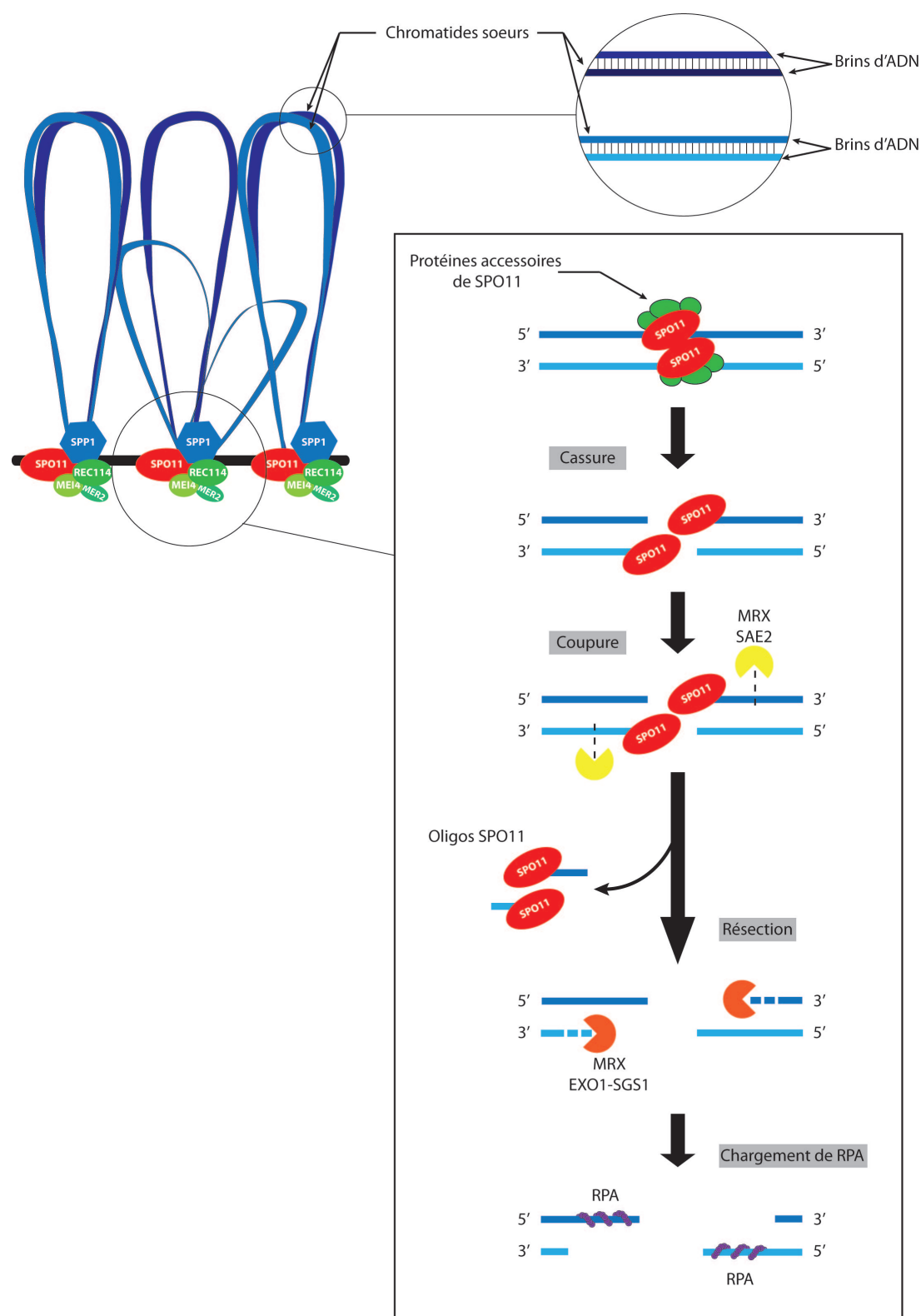


FIGURE 2.2 – Mécanisme moléculaire de la formation des DSB et de leur résection chez *S. cerevisiae*. SPO11 et ses protéines accessoires sont recrutées sur la chromatine et procèdent à la cassure grâce à l'activité topoisomérase de SPO11. SPO11 reste accrochée sur la chromatine, le complexe MRX et SAE2 coupe en 3' de la DSB ce qui mène au relargage des oligos SPO11. EXO1-SGS1 (et peut-être MRX) dégrade l'ADN de 5' vers 3', libérant l'extrémité 3' du brin complémentaire. Ce brin est alors pris en charge par la protéine RPA. Inspiré de NEALE et al. 2005.

combinée du complexe MRX (MRE11-RAD50-XRS2) chez *S.cerevisiae*, aussi appelé complexe MRN (MRE11-RAD51-NBS1) chez les autres espèces dont *Arabidopsis* (MERCIER et al. 2008) ; et de SAE2 aussi connue sous le nom de CtIP chez les mammifères (SARTORI et al. 2007) et de COM1 chez *C.elegans* et *Arabidopsis* (PENKNER et al. 2007 ; UANSCHOU et al. 2007). La résection se fait en deux étapes. D’abord par l’action de MRX-SAE2 qui relâche SPO11 de la chromatine grâce à la formation d’une coupure en 3’ de la liaison de SPO11 (NEALE et al. 2005), libérant ainsi ce que l’on appelle les oligos SPO11. Puis SGS1, DNA2 et EXO1 agissent pour une résection sur une plus grande longueur (ZHU et al. 2008).

Les extrémités flanquantes sont ensuite prises en charge par RPA (SHINOHARA et al. 1992 ; SOUSTELLE et al. 2002). RPA pourrait être impliquée dans l’élimination des structures secondaires du simple-brin d’ADN pour y favoriser le recrutement des recombinaises (SUNG 2003). *Arabidopsis* possède cinq paralogues de RPA et si RPA1p semble être l’orthologue vrai, une certaine redondance est néanmoins probable puisque que le mutant *rpa1p* peut encore former quelques crossovers (OSMAN et al. 2009).

2.2 L’invasion simple brin

La recombinaison homologue procède à la réparation des DSB en utilisant une séquence homologue comme matrice. En mitose, la HR utilise préférentiellement la chromatide sœur comme matrice de réparation (KADYK et al. 1992 ; LAO et al. 2013). En méiose, un biais vers une réparation sur une chromatide homologue non sœur assure la formation des crossovers. La recherche d’homologie et l’invasion du brin d’ADN homologue sont réalisées par deux recombinaises, RAD51 et DMC1.

2.2.1 RAD51 et DMC1, deux recombinaises

RAD51 et DMC1 sont deux protéines homologues présentant 45% d’identité chez la levure *S.cerevisiae* (BISHOP et al. 1992) et 50% chez *Arabidopsis*. Elles sont homologues à la protéine RECA d’*Escherichia coli* (15% d’identité) qui s’assemble en filament nucléo-protéique en spirale autour d’un brin d’ADN (Figure 2.3). Chez *E.coli*, l’agrégat d’ADN et de RECA serait capable de faire un grand nombre de contacts avec une matrice ADN pour chercher l’homologie (HOWARD-FLANDERS et al. 1984). Ces contacts seraient établis de façon transitoire, sur un système d’essai-erreur, jusqu’à trouver une séquence homologue dont la complémentarité de séquence assure la stabilité de l’interaction (DANILOWICZ et al. 2012 ; DANILOWICZ et al. 2014).

RAD51 et DMC1, comme RECA, possèdent deux domaines actifs principaux : le site I

nécessaire à la polymérisation sur l'ADN, et le site II nécessaire à la recherche d'homologie et l'activité d'échange de brins. Après la résection, RAD51 et DMC1 vont être chargées sur la chromatine en remplaçant RPA (Figure 2.3). Elles sont arrangées en filament, nommé filament présynaptique, et vont provoquer l'invasion simple brin d'une des extrémités de la DSB (*single end invasion*, SEI, HUNTER et al. 2001). Cette invasion mène à la formation de la D-loop (Figure 2.3). Leurs activités *in vitro* sont donc très proches, mais leurs rôles biologiques sont pourtant très différents (ci-dessous).

2.2.2 RAD51 indispensable à la réparation

RAD51 fait partie d'un même groupe de protéines que RAD50 à RAD57 essentielles pour la HR somatique et le maintien de l'intégrité du génome chez *S.cerevisiae* suite à la formation de cassures double-brin (GAME et al. 1974). Ces protéines sont appelées RAD, pour *radiation sensitive* (sensible aux radiations). Les mutants *rad51* de *S.cerevisiae* sont hypersensibles aux radiations ionisante (qui créent des cassures double-brin) et présentent une diminution marquée de la recombinaison somatique (SAEKI et al. 1980). Chez les mammifères, les cellules accumulent des aberrations chromosomiques et finissent par mourir après déplétion de la protéine RAD51 (SONODA et al. 1998). La mutation du gène *RAD51* est létale chez l'embryon de souris au delà de la première division mitotique (TSUZUKI et al. 1996). Chez *Arabidopsis*, les mutants *rad51* ne montrent pas de défaut somatique en condition normale, mais sont plus sensibles aux agents génotoxiques (DA INES et al. 2013).

En méiose, les mutants *rad51* de *S.cerevisiae* ne produisent pas de spores viables. Moléculairement, ils accumulent les DSB (SHINOHARA et al. 1992), ne forment pas de foyers DMC1, les extrémités 3' sont résectées sur une plus grande longueur et les mutants forment trois fois moins de CO que le sauvage (SHINOHARA et al. 1997). La méiose des mutants *rad51* d'*Arabidopsis* est fortement perturbée avec une fragmentation importante (dépendante de SPO11) et aucune formation de graines (LI et al. 2004) (voir Table 2.1). RAD51 est donc indispensable pour la réparation des cassures double-brin en mitose comme en méiose.

De nombreux régulateurs de RAD51 ont été identifiés en HR somatique chez *S.cerevisiae*. RAD55 et RAD57 interagissent directement avec RAD51 et sont importants pour le chargement de RAD51 sur le filament RPA, et la stabilisation du filament RAD51 (LIU et al. 2011). Le complexe Shu (composé de PSY1, CSM2, SHU1 et SHU2) promeut aussi

TABLE 2.1 – **Les mutants affectés dans l’invasion simple brin chez *Arabidopsis thaliana***. Le nombre de CO est estimé par des techniques cytologiques (étalement chromosomiques). IH : réparation inter-homologue. IS : réparation inter-sœur. n.d : non déterminé. N/A : non applicable. Comparaisons aux valeurs chez le sauvage (Col-0 WT) : ** $p < 0,05$ —*** $p < 0,01$.

	Synapsis	Nombre de CO	Réparation des DSB	Foyers DMC1	Foyers RAD51
Col-0 (WT)	Complet	9	Complet (IH+IS)	234±89 (UANSCHOU et al. 2014)	224±78 (UANSCHOU et al. 2014)
<i>rad51</i>	Absent (VIGNARD et al. 2007)	N/A	Défectueux (fragmentation)	50±11***	N/A
<i>dmc1</i>	Absent (VIGNARD et al. 2007)	0	IS	N/A	n.d.
<i>sds</i>	Absent (DE MUYT et al. 2009)	0	IS	Aucun (DE MUYT et al. 2009)	n.d.
<i>mnd1</i>	Absent (VIGNARD et al. 2007)	N/A	Défectueux (fragmentation)	87±16***	210±41 (UANSCHOU et al. 2014)
<i>hop2-1</i>	Absent (DE MUYT et al. 2009)	N/A	Défectueux (fragmentation)	182±47 (UANSCHOU et al. 2014)	188±78 (UANSCHOU et al. 2014)
<i>hop2-2</i>	n.d.	0.5 (UANSCHOU et al. 2014)	IS	227±89 (UANSCHOU et al. 2014)	169±39**
<i>asy1</i>	Partiel	1.63 (ROSS et al. 1997)	IS (IH réduit)	Aucun (SANCHEZ-MORAN et al. 2007)	n.d.
<i>rad51B</i>	Complet (BLEUYARD et al. 2005)	n.d.	Complet (IH+IS)	n.d.	n.d.
<i>rad51C</i>	Complet (BLEUYARD et al. 2005)	N/A	Défectueux (fragmentation)	n.d.	n.d.
<i>rad51D</i>	n.d	n.d	Probablement complet (IH+IS) (DURRANT et al. 2007)	n.d.	n.d.
<i>xrcc2</i>	Complet	n.d	Complet (IH+IS) (BLEUYARD et al. 2005)	n.d.	n.d.
<i>xrcc3</i>	Complet (BLEUYARD et al. 2005)	N/A	Défectueux (fragmentation)	n.d.	n.d.

l'activité de RAD51 (KREJCI et al. 2012). RAD54 et RDH54/TID1 agissent à la fois positivement (promotion de l'invasion) et négativement (pour retirer RAD51 et permettre la synthèse d'ADN) (CHI 2006 ; MAZIN et al. 2010 ; SOLINGER et al. 2002).

Cinq paralogues de RAD51 peuvent être identifiés dans les génomes eucaryotes : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3. Ces paralogues proviennent probablement de duplication de gènes, et auraient acquis par la suite de nouvelles fonctions au cours de leur évolution (PRADILLO 2014). Leurs rôles ne sont pas bien définies. Chez les mammifères, des études biochimiques ont montré que RAD51C pourrait faciliter l'appariement des chromosomes et que XRCC3 aurait une affinité particulière pour l'ADN simple brin (KURUMIZAKA et al. 2001). Ces deux protéines promeuvent le chargement de RAD51 de RAD51 sur la chromatine (BISHOP et al. 1998 ; MASSON 2001 ; WIESE et al. 2002). Chez *Arabidopsis*, *xrcc3* et *rad51C* présentent le même phénotype méiotique que *rad51* : la prophase montre une absence de synapsis et dès la métaphase, les chromosomes montrent de la fragmentation (BLEUYARD et al. 2005 ; LI 2005 ; VIGNARD et al. 2007). Ce n'est pas le cas chez *rad51b*, *rad51d* et *xrcc2* qui montrent une progression normale de la méiose (BLEUYARD et al. 2004 ; DA INES et al. 2013 ; DURRANT et al. 2007 ; WANG et al. 2013). Les protéines RAD51B et XRCC2 ont été récemment montrées comme étant des facteurs anti-crossovers dans une étude chez *Arabidopsis* (DA INES et al. 2013). Leur rôle dans ce processus n'a pas été caractérisé.

2.2.3 DMC1 et le biais inter-homologue

DMC1, le deuxième homologue de RECA chez les eucaryotes, est exprimé de façon méiose spécifique (BISHOP et al. 1992 ; DOUTRIAUX et al. 1998 ; HABU et al. 1996). *DMC1* polymérise en filament présynaptique sous l'action de MEI5-SAE3 qui contrecarrent l'inhibition de RPA (FERRARI et al. 2009). MEI5-SAE3 sont capables de lier à la fois RPA et *DMC1*, ce qui semble confirmer leur rôle dans le recrutement de *DMC1* aux filaments RPA (FERRARI et al. 2009). MND1 et HOP2 sont deux co-facteurs de l'activité d'échange de brins de *DMC1* (CHEN et al. 2004). Les foyers MND1 et HOP2 ne co-localisent pas avec les foyers *DMC1* (VIGNARD et al. 2007 ; ZIERHUT et al. 2004) et il a été proposé que ces deux protéines aient plutôt un rôle dans l'accessibilité de la chromatine pour les recombinaisons que dans une régulation biochimique *per se*. Chez *Arabidopsis*, la cycline SDS est un régulateur de *DMC1* et les mutants *sds* présentent le même phénotype que *dmc1*, avec notamment une absence de synapsis, aucun foyer *DMC1* détectable et une réparation des cassures dépendante de RAD51 sur la chromatide sœur (AZUMI et al. 2002 ; DE MUYT et al. 2009, Table 2.1).

TABLE 2.2 – Les protéines de l'invasion simple brin et du biais inter-homologue

<i>A.thaliana</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.elegans</i>	<i>M.musculus</i>	Rôle
Protéines des axes du SC				
ASY1 (CARYL et al. 2000) ASY3 (FERDOUS et al. 2012) ASY4	HOP1 (LATYPOV et al. 2010) RED1 (KIM et al. 2010)	HIM-3 (ZETKA et al. 1999)	SYCP2 (OFFENBERG et al. 1998) SYCP3 (LAMMERS et al. 1994) HORMAD1 HORMAD2	Axe latéral
ZYP1 (HIGGINS et al. 2005)	ZIP1 (SYM et al. 1993)	SYP-1 SYP-2 (BHALLA 2005)	SYCP1 (MEUWISSEN et al. 1992)	Élément central
REC8 (BHATT et al. 1999)	REC8 (WATANABE et al. 1999)	REC8 (PASIERBEK 2001)	REC8 (XU et al. 2005)	Cohésine
RAD51 et ses régulateurs				
RAD51 (DOUTRIAUX et al. 1998)	RAD51 (SHINOHARA et al. 1997)	RAD-51 (ALPI et al. 2003)	RAD51 (TARSOUNAS et al. 1999)	Recombinase
	MEK1 (TERENTYEV et al. 2010)			Kinase inhibitrice de RAD51
	HED1 (TSUBOUCHI et al. 2006a)			Inhibiteur de RAD51
RAD54 (SHAKED et al. 2005)	RAD54 (NIU et al. 2005)		RAD54 (WESOLY et al. 2006)	Phosphorylée par MEK1, inhibe RAD51
	TID1 (NIMONKAR et al. 2012)			Localisation de DMC1 et RAD51
DMC1 et ses régulateurs				
DMC1 (DOUTRIAUX et al. 1998)	DMC1 (BISHOP et al. 1992)		DMC1 (YOSHIDA et al. 1998)	Recombinase
SDS (AZUMI et al. 2002)				Localisation de DMC1
HOP2 (SCHOMMER et al. 2003)	HOP2 (LEU et al. 1998)		HOP2 (PETUKHOVA et al. 2005)	Co-facteur de DMC1
MND1 (KERZENDORFER et al. 2006)	MND1 (RABITSCH et al. 2001)		MND1 (PETUKHOVA et al. 2005)	Co-facteur de DMC1

Chez la levure, la prise en charge des DSB par RAD51 en absence de DMC1 est inhibée par HED1 : le simple mutant *dmc1* fragmente mais le double mutant *dmc1 hed1* répare correctement ses DSB sur la chromatide sœur de façon RAD51 dépendante (HONG et al. 2013; LAO et al. 2013; TSUBOUCHI et al. 2006a). De la même façon, la kinase MEK1 inhibe l'activité d'échange de brin de RAD51, et le double mutant *dmc1 mek1* répare les DSB en utilisant la chromatide sœur comme matrice (HOLLINGSWORTH et al. 1989; NIU et al. 2005; THOMPSON et al. 1999, voir aussi SCHWACHA et al. 1997). Les mutants *dmc1* d'*Arabidopsis* montrent une réparation complète des DSB, mais sans qu'aucun CO ne soit formé, menant à la conclusion que les DSB sont réparées en utilisant la chromatide sœur comme matrice de réparation, et ce grâce à l'action de RAD51 (COUTEAU et al. 1999; DE MUYT et al. 2007; VIGNARD et al. 2007). Toutes ces données impliquent que DMC1 est essentielle pour la réparation sur le chromosome homologue et pour effectuer la réparation des DSB en formant des crossovers.

Il a été montré que RAD51 était aussi un co-facteur de DMC1. Tout d'abord, la formation des foyers DMC1 dépend de RAD51, comme l'atteste la diminution drastique du nombre de foyers chez le mutant *rad51* d'*Arabidopsis* (VIGNARD et al. 2007, Table 2.1) et l'absence de formation du filament DMC1 chez les mutants *rad51* de levure (BISHOP 1994). De plus, RAD51 stimule l'activité de formation des D-loop de DMC1 (CLOUD et al. 2012). Des expériences de mutagenèse dirigée contre le site II de RAD51 (nécessaire pour son activité d'échange de brin, mais pas pour sa polymérisation sur l'ADN simple brin) montrent que la polymérisation de RAD51 sur le simple brin d'ADN est nécessaire et suffisante à la stimulation de DMC1, mais que son activité d'échange de brin est superflue, faisant de DMC1 la recombinaise principale dans l'échange de brin, aidée par RAD51 (CLOUD et al. 2012). Des résultats appuyant cette conclusion ont été obtenus chez *A.thaliana* (DA INES et al. 2013). De même, HED1 stabilise l'association de RAD51 à l'ADN (BUSYGINA et al. 2012) et inhibe son activité d'échange de brin (révélé dans le fond *dmc1*), impliquant que HED1 convertit la recombinaise RAD51 en un "simple" régulateur de la recombinaison.

Il a aussi été montré que DMC1 régulait négativement RAD51. Chez *S.cerevisiae*, le simple mutant *hed1* forme moins d'intermédiaires de type SEI et moins de doubles jonctions de Holliday (sur la sœur) que le mutant *hed1 dmc1* (HONG et al. 2013; LAO et al. 2013). Ces données montrent que dans le mutant *hed1*, la présence de DMC1 empêche l'invasion simple brin. De la même façon, chez *Arabidopsis*, tous les mutants *hop2* présentent une fragmentation des chromosomes en métaphase, supprimée par la mutation *dmc1*, impliquant que la réparation sur la chromatide sœur par RAD51 dans les mutants *hop2* est inhibée par la présence de DMC1 (UANSCHOU et al. 2014). Cette inhibition serait importante pour pouvoir promouvoir le choix de la chromatide homologue, dans une relation de

compétition entre RAD51 et DMC1 pour la réparation des DSB (LIU et al. 2014). Cette inhibition serait transitoire, pour permettre à RAD51 de réparer certains intermédiaires sans DMC1 par la suite (HONG et al. 2013; UANSCHOU et al. 2014). Les modalités du contrôle de l'activité de DMC1 et RAD51 restent encore floues et représentent un domaine de recherche fécond.

En méiose, la protéine MCM8 d'*Arabidopsis* pourrait aider RAD51 à réparer les cassures sur la chromatide sœur, en parallèle de DMC1 : le mutant *mcm8* montre une légère fragmentation, amplifiée par la mutation de DMC1 (CRISMANI et al. 2013). Ces résultats reflètent ceux obtenus chez la souris : le mutant *mcm8* accumule les foyers DMC1, présente des problèmes de synapsis et un défaut de la réparation des cassures (LUTZMANN et al. 2012). Il a été proposé que MCM8 définirait une voie de réparation des DSB parallèle à DMC1. En effet, en absence de la protéine DMC1, les DSB sont efficacement réparés chez *Arabidopsis* en utilisant la chromatide sœur comme matrice de réparation (COUTEAU et al. 1999). Cette réparation dépend de RAD51 (DE MUYT et al. 2009; VIGNARD et al. 2007) et de MCM8 (CRISMANI et al. 2013). Les auteurs ont donc suggéré que MCM8 et RAD51 pouvaient coopérer pour la réparation des cassures.

2.2.3.1 Modèles de chargement de DMC1 et RAD51 autour des cassures

Les modalités de chargement de RAD51 et DMC1, leur mode d'action pour la recherche d'homologie et pour la promotion de l'invasion sur l'homologue connaissent un regain d'attention ces dernières années. Basés sur des études cytologiques de localisation des protéines en méiose et des activités biochimiques de chacune, deux modèles existent aujourd'hui.

Le premier implique que de chaque côté de la cassure, les extrémités 3' flanquantes soient prises en charge soit par RAD51, soit par DMC1 (Figure 2.3C), comme le suggère la présence de doublets RAD51-DMC1 non chevauchants, interprétés comme encadrant la cassure double-brin (RAD51 d'un côté, DMC1 de l'autre, KURZBAUER et al. 2012; SHINOHARA et al. 1997). Ce modèle reste attractif puisqu'il est bien corrélé à des observations génétiques d'asymétrie de la réparation des DSB (un seul brin envahit le brin homologue, HUNTER et al. 2001; NEALE et al. 2005).

Un autre modèle développé grâce à l'essor de la microscopie à haute résolution propose que chaque extrémité soit chargée à la fois par RAD51 et DMC1 de chaque côté de la cassure (Figure 2.3D, BISHOP 2012). Ce modèle implique une proximité physique entre les deux recombineses et permet de prendre en compte les données biochimiques évoquées ci-dessus, à savoir que RAD51 est un cofacteur de DMC1, et que DMC1 inhibe RAD51.

La proportion de cassures réparées sur la chromatide sœur est difficile à estimer,

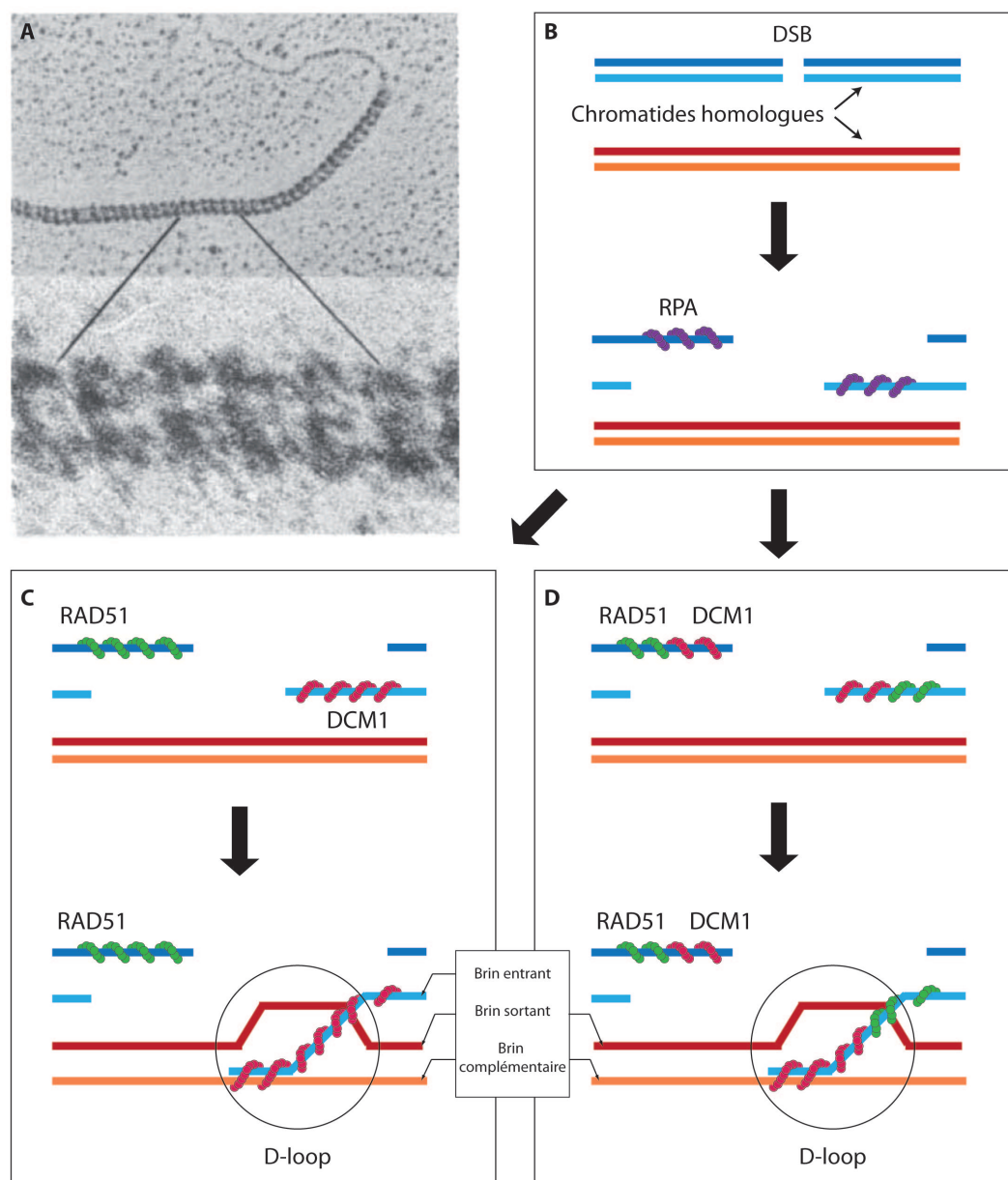


FIGURE 2.3 – **Invasion simple-brin et formation de la D-loop** grâce aux protéines RAD51 et DMC1. A) Brin d'ADN complexé par la protéine RECA d'*Escherichia coli* en microscopie électronique, avec son agrandissement. Photographie issue de HOWARD-FLANDERS et al. 1984. B) La cassure double brin affecte l'une des chromatides homologues, puis est résectée et le brin 3' flanquant est complexé par la protéine RPA. RAD51 et DMC1 sont ensuite chargées à la place de RPA et procèdent à l'invasion simple brin, pour aboutir à la formation de la D-loop. Deux modèles ont été proposés pour ce chargement. C) Modèle de KURZBAUER et al. 2012 où RAD51 et DMC1 sont chargés sur les brins opposés de chaque côté de la cassure. D) Modèle de BISHOP 2012 où RAD51 et DMC1 sont chacun présents de chaque côté en polymères non mixtes.

puisque par définition ce mode de réparation n'a pas de conséquence génétique. Des approches moléculaires chez la levure ont néanmoins permis d'observer ces intermédiaires et ont montré que seuls 20% des DSB étaient réparées sur la sœur chez *S.cerevisiae* à l'inverse de *S.pombe* qui répare la majorité sur la sœur (HYPPA et al. 2010 ; SCHWACHA et al. 1995). Chez les plantes, aucune information n'est disponible sur ce sujet.

2.2.4 Le biais par les protéines de l'axe

En dehors des recombinaisons et de leurs protéines accessoires, d'autres acteurs sont nécessaires à un biais efficace, notamment les protéines des axes chromosomiques et du complexe synaptonémal.

Le mutant de l'axe *red1* de levure présente une réduction de 75% de formation de CO et de NCO sur l'homologue par rapport au WT, montrant une baisse de l'engagement des intermédiaires de recombinaison sur le chromosome homologue (SCHWACHA et al. 1997). Il a aussi été proposé que la phosphorylation de HOP1 (la protéine de l'axe latéral chez *S.cerevisiae*) en réponse à la formation des DSB pouvait activer la phosphorylation de MEK1 qui pourrait alors inhiber RAD51 pour limiter la réparation sur la sœur (NIU et al. 2005, 2009). Chez *Arabidopsis*, les mutants *asy1* et *asy3* présentent un défaut de formation de CO mais pas de défaut de réparation, ce qui laisse penser que ASY1 et ASY3 (des protéines de l'axe latéral du SC, homologue à HOP1, Table 2.2) est importante pour imposer le biais inter-homologue (FERDOUS et al. 2012 ; SANCHEZ-MORAN et al. 2007).

Chez *C.elegans*, *D.melanogaster* et *Neurospora crassa*, le synapsis précède la recombinaison et est indépendant de la recombinaison. De plus, chez ces espèces, aucun homologue de DMC1 (ni de MND1-HOP2) n'ont été mis en évidence. Des données suggèrent que le biais vers l'homologue soit lié à la présence de l'axe central du complexe synaptonémal. HIM-3, une protéine de l'axe latéral chez *C.elegans*, a été proposée comme inhibant le choix de la sœur comme matrice de réparation chez cette espèce (COUTEAU et al. 2004), tout comme la protéine cohésive ORD de la drosophile est aussi impliquée dans le biais vers l'homologue (WEBBER et al. 2004).

Il a longtemps été sous-entendu que le choix de la matrice de réparation par défaut était la chromatide sœur, et qu'en méiose, le biais vers l'homologue était essentiel à la formation des CO. Un nouveau modèle est aujourd'hui proposé, basé sur des données du mutant *rec8* chez la levure (HONG et al. 2013) : l'homologue serait choisi par défaut, d'une façon encore non élucidée, et les cohésines promouvraient un biais vers la sœur en mitose comme en méiose ("*cohesin channeling*"). En méiose, l'effet des cohésines serait contrebalancé par les protéines RED1, HOP1 et MEK1 pour assurer la formation des CO. L'établissement du biais par DMC1 mais aussi la maintenance de ce biais (à travers la

stabilisation des intermédiaires engagés sur l'homologue, par HED1 notamment) seraient cruciaux pour former les CO en méiose (voir aussi Discussion, page 208).

Toutes ces données montrent que la régulation de l'invasion simple brin est sous le contrôle de multiples facteurs (axes, DCM1 et ses régulateurs, phosphorylations. . .) dont les effets sont intégrés pour promouvoir efficacement la formation des CO entre chromosomes homologues.

2.3 Les voies de formation des crossovers

Après l'invasion simple brin, différentes issues sont possibles et seront détaillées dans les prochaines parties. La D-loop peut notamment être stabilisée par la capture du second brin (*second end capture*, SEC) après extension de la boucle et par complémentarité de séquence entre le brin sortant et la deuxième extrémité 3' (Figure 2.5). Des jeux de synthèses, initiés par les extrémités 3' qui fonctionnent comme des amorces, permettent d'obtenir *in fine* le produit canonique de double-jonction de Holliday (voir 2.3.1). La représentation faite ici ne tient pas compte de la dynamique incessante de formation et dénouement des intermédiaires de recombinaison (Figure 2.4, voir aussi section 3.3).

La formation de la D-loop est un carrefour dans la résolution des DSB. Cet intermédiaire peut être pris en charge par différents facteurs protéiques en compétition les uns avec les autres pour former deux produits finaux : les crossovers et les non crossovers (Figure 2.4). Deux voies de formation des CO ont été mises en évidence chez les eucaryotes. La première dépend des protéines dites ZMM, l'autre de la protéine MUS81. Ces protéines sont fonctionnellement très conservées (Table 2.3). Ces deux voies ne forment pas de CO à partir des mêmes intermédiaires, et les CO produits ne présentent pas les mêmes caractéristiques (voir ci-dessous et chapitre 3).

2.3.1 Les protéines ZMM

La voie ZMM, ou voie I de formation des crossovers, est la voie principale de formation des CO chez *S.cerevisiae*, *Sordaria*, les mammifères et les plantes (BÖRNER et al. 2004 ; MÉZARD et al. 2007 ; REYNOLDS et al. 2013 ; ZICKLER 2006), et la seule voie chez *C.elegans* (HILLERS et al. 2003). Le nom de ce groupe de protéines, ZMM, vient des sept protéines suivantes : les protéines ZIP1-ZIP2-ZIP3-ZIP4, l'hétérodimère MSH4-MSH5 et l'hélicase MER3. Les homologues de ces protéines ne sont pas appelés de la même façon chez toutes les espèces (Table 2.3). Quelques membres supplémentaires ont été découverts ensuite : la protéine SPO16 de levure (SHINOHARA et al. 2008), la protéine PTD

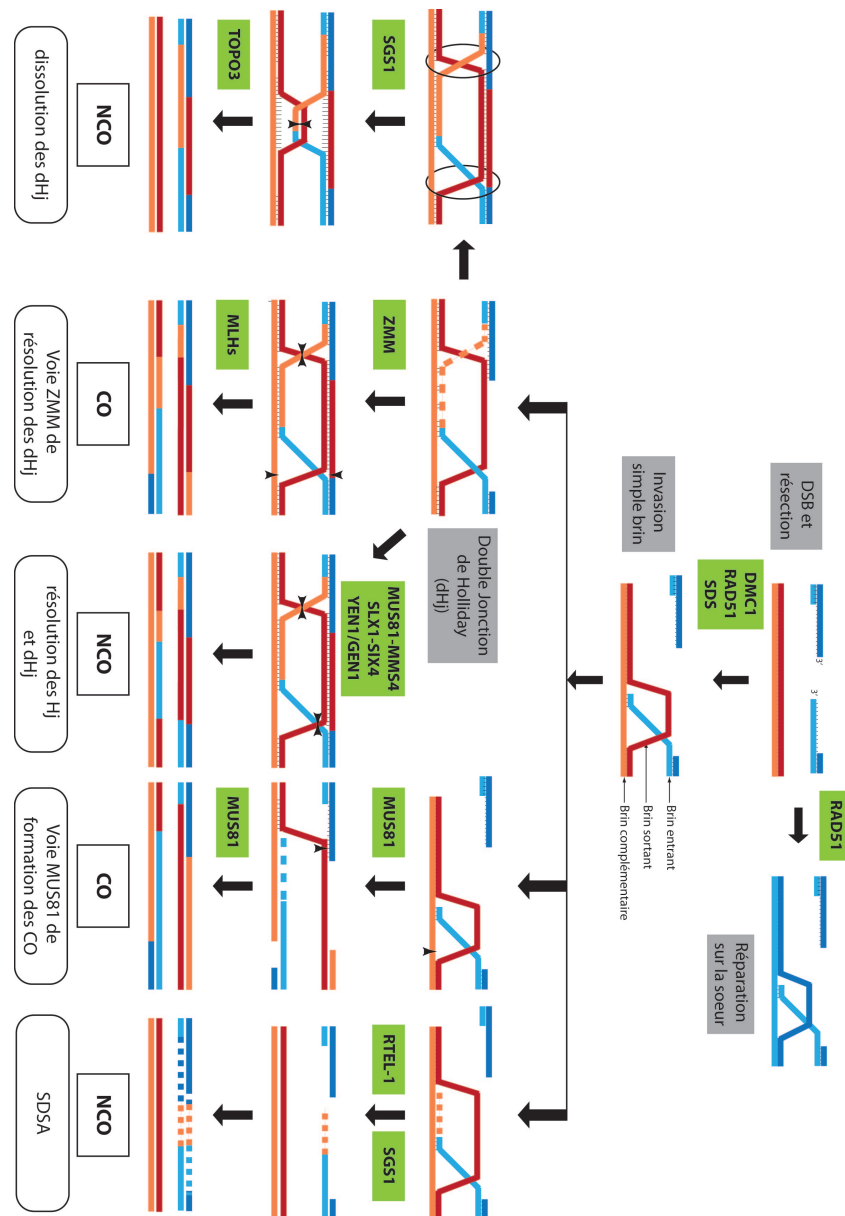


FIGURE 2.4 – Modèle présentant les différentes voies de formation des CO et des NCO à partir de la formation de la D-loop. Partie gauche : après l'invasion simple brin, la capture du second brin peut mener à la formation d'une double-jonction de Holliday (dHj). Cette dHj peut être stabilisée par les ZMM et résolue pour former un CO (de voie I), ou alors résolue de façon symétrique pour donner un NCO. Les jonctions peuvent aussi migrer l'une vers l'autre sous l'action des protéines du complexe BTB dont SGS1 et mener à la formation d'un hémicaténa qui sera résolu par TOP3, d'où résulte la formation d'un NCO. Partie droite : MUS81 pourrait agir sur des intermédiaires précoces pour former les CO de voie II. Les protéines RTEL-1 et SGS1 ont été mises en cause dans la déstabilisation de l'invasion simple brin, les intermédiaires étant alors pris en charge par la voie SDSA (*synthesis-dependant strand annealing*, hybridation des brins dépendante de la synthèse) qui, après synthèse, va permettre de religner les brins coupés et former un NCO. Adapté d'après DE MUYT et al. 2012 ; LORENZ et al. 2006 ; WHITBY 2005.

d'*Arabidopsis* (MACAISNE et al. 2008), et les protéine HEI10 (CHELYSHEVA et al. 2012; DE MUYT et al. 2014; REYNOLDS et al. 2013). Ces protéines ont été classées dans un même groupe fonctionnel car leurs mutations sont épistatiques chez la levure, et cette propriété s'est révélée extrêmement bien conservée chez les autres organismes (LYNN et al. 2007).

Chez *Arabidopsis*, les mutants *zmm* présentent un défaut de formation des CO avec un taux résiduel de 15% par rapport au sauvage chez *shoc1*, *ptd*, *hei10*, *zip4*, *msh4*, *msh5* et 25% chez *mer3*. Contrairement à *S.cerevisiae*, les mutants ne présentent pas de problèmes de synapsis (CHELYSHEVA et al. 2007, 2012; HIGGINS et al. 2004, 2008; MACAISNE et al. 2011; MACAISNE et al. 2008; MERCIER et al. 2005). Cette réduction du nombre de CO entraîne un déficit de formation de gamètes viables, donc de graines, ce qui se reflète à l'échelle macroscopique sur la longueur des fruits chez *Arabidopsis*, qui sont notablement plus courts chez les mutants *zmm* que chez le sauvage. Si ces protéines sont classées dans le même groupe d'épistasie, aucune homologie de séquence n'existe entre elles, et leurs fonctions, quand elles sont connues, sont très variées.

ZIP1 est une des protéines de l'élément central du SC (voir 1.2.3) et son implication dans la formation des CO est difficilement étudiable en dehors de son rôle structurel dans le synapsis. ZIP1 interagit avec les autres protéines ZIP (TSUBOUCHI et al. 2006b) et il est donc probable que ZIP1 participe à la formation des CO en régulant l'assemblage d'un complexe ZMM fonctionnel sur l'axe. Chez *Arabidopsis*, l'inactivation par RNAi des deux gènes *AtZYP1A* et *AtZYP1B* mène à une réduction de seulement 20% de la formation des CO et à la formation de multivalents et de bivalents entre chromosomes non homologues, ce qui pourrait laisser penser que ZYP1 pourrait réguler la recherche d'homologie lors de la formation des CO ou restreindre les interactions ectopiques (HIGGINS et al. 2005), mais qui pourrait aussi être un artefact dû à la méthode d'inactivation. Chez l'orge, l'inactivation par RNAi mène aussi à une réduction du nombre de bivalents, mais sans apparition de multivalents (BARAKATE et al. 2014). Chez le riz l'inactivation de l'unique homologue par insertion d'un transgène mène à une augmentation par 3 du nombre de chiasma sur un intervalle du chromosome 11 (et à des problèmes de division post-méiotiques entraînant une stérilité du pollen, WANG et al. 2010b). Ces phénotypes contradictoires sont peut-être dus à une différence fondamentale dans le rôle de la protéine ZIP1 chez ces trois espèces, ou à l'effet du mode d'inactivation des gènes.

Chez *Arabidopsis*, la protéine SHOC1 est l'homologue de ZIP2 (MACAISNE et al. 2011). C'est une *bona fide* protéine ZMM et sa mutation mène au phénotype canonique des mutants *zmm* (réduction drastique du nombre de CO, MACAISNE et al. 2008). Les protéines ZIP2/SHOC1 possèdent un domaine HhH semblable à celui des protéines XPF/MUS81, et il a été montré que SHOC1 fonctionne en duo avec PTD, comme MUS81 avec EME1

(MACAISNE et al. 2011, voir 2.3.2). Le rôle biochimique précis de ZIP2 et de ses homologues est encore inconnu.

TABLE 2.3 – **Les protéines ZMM** sont impliquées dans la formation des CO de voie I

<i>A.thaliana</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.elegans</i>	<i>M.musculus</i>	<i>S.macrospora</i>
ZYP1	ZIP1	SYP-1 SYP-2	SYCP1	–
SHOC1	ZIP2	–	C9ORF84	–
PTD	–	–	–	–
	ZIP3	ZHP-3	RNF212	
HEI10	–	–	HEI10	HEI10
ZIP4	ZIP4 (SPO22)	–	TEX11	–
–	SPO16	–	–	–
MER3	MER3	–	HFM1	MER3
MSH4	MSH4	HIM-14 (MSH-4)	MSH4	–
MSH5	MHS5	MSH-5	MSH5	–

Chez la levure, ZIP3 interagit avec MRE11, RAD51 et MSH5 (AGARWAL et al. 2000), ce qui pourrait impliquer cette protéine dans la régulation de la transition entre la résection et la formation de dHj. ZIP3 est une protéine E3 ligase, qui serait impliquée dans la SUMOylation et/ou l'ubiquitination de cibles encore inconnues (QIAO et al. 2014). Des homologues sont identifiables chez d'autres espèces, notamment chez *C.elegans* (BHALLA et al. 2008) mais il semblerait qu'une autre E3 ligases, HEI10, soit l'équivalent fonctionnel chez *Arabidopsis* et *Sordaria* (CHELYSHEVA et al. 2012 ; DE MUYT et al. 2014). La souris semble posséder les deux gènes : un homologue de ZIP3 (RNF212, REYNOLDS et al. 2013) et un homologue de HEI10 (WARD et al. 2007), qui auraient acquis des rôles différents au cours de l'évolution (QIAO et al. 2014). RNF212 et HEI10 semblent en effet avoir des rôles antagonistes : RNF212 serait important pour le chargement des protéines MSH4 et MSH5 (ci-dessous) sur les sites de CO, tandis que HEI10 serait nécessaire à leur élimination dynamique pour assurer la progression de la réparation des DSB (QIAO et al. 2014). Il semblerait donc que RNF212 soit l'équivalent fonctionnel de HEI10 chez *Arabidopsis* et *Sordaria*, tandis que HEI10 de souris aurait acquis une fonction différente. Pour appuyer cette observation, la dynamique de RNF212 de souris se rapproche de celle des protéines HEI10 d'*Arabidopsis* et de *Sordaria macrospora* : le signal apparaît d'abord sous forme de patches ou de foyers présents sur les parties synapsées des chromosomes, puis est restreint

aux sites de désignation des crossovers (CHELYSHEVA et al. 2012 ; DE MUÏT et al. 2014 ; REYNOLDS et al. 2013).

Le chargement de ZIP3 sur la chromatine semblerait, chez la levure, permettre le recrutement de ZIP2 et ZIP4, qui permettrait à leur tour d'initier la polymérisation de ZIP1 (AGARWAL et al. 2000 ; TSUBOUCHI et al. 2006b).

Les protéines MSH4 et MSH5 sont des protéines homologues à la protéine MutS d'*E.coli* qui reconnaît les distorsions de l'ADN dues aux mésappariements (HOFFMANN et al. 2004). MSH4-MSH5 fonctionnent en dimère (POCHART et al. 1997) et agiraient comme un anneau pour stabiliser les invasions (SEI) et former les doubles jonctions de Holliday (SNOWDEN et al. 2004). MSH4-MSH5 protégeraient notamment les intermédiaires de l'action de SGS1 (DE MUÏT et al. 2012, voir 3.3).

MER3 est une hélicase et pourrait permettre de favoriser la formation de dHj en promouvant la synthèse d'ADN et l'extension de la D-loop (Figure 2.5, GUIRALDELLI et al. 2013 ; MAZINA et al. 2004).

L'ordre dans lequel les protéines ZMM jouent leur rôle pour promouvoir et stabiliser les dHj reste peu connu. Une étude de l'interdépendance entre ces protéines pour leur localisation chez le riz a mis en évidence que MSH5 agirait avant ZIP4 (LUO et al. 2013) qui lui-même agirait avant MER3 (CHEN et al. 2012). Toujours chez le riz, la localisation de HEI10 ne dépend pas de MER3 jusqu'au stade pachytène, mais la formation des gros foyers spécifiques des CO ne se forment pas en l'absence de MER3 (WANG et al. 2012). Chez la levure, il semblerait que ZIP1 et ZIP3 puissent recruter ZIP2-ZIP4-SPO16 d'un côté et MSH4-MSH5 de l'autre, MER3 étant alors recruté probablement par MSH4-MSH5 (AGARWAL et al. 2000 ; SHINOHARA et al. 2008).

2.3.2 La voie MUS81

La voie de formation des crossovers dépendante de la protéine MUS81 ne repose pas sur la formation de double jonctions de Holliday, contrairement à la voie ZMM (HOLLINGSWORTH 2004 ; OSMAN et al. 2003). MUS81 est une protéine à domaine nucléase de type ERCC4. Elle fonctionne en tandem avec une protéine régulatrice, EME1 chez les mammifères et MMS4 chez la levure (CICCIA et al. 2008). Il est aujourd'hui considéré que MUS81 est capable de prendre en charge un grand nombre d'intermédiaires branchés de l'ADN, considérés comme toxiques pour la cellule d'un point de vue intégrité du génome, et qu'elle serait l'endonucléase "à tout faire" pour résoudre les molécules complexes non dissoutes et former des CO (Figure 2.6, JESSOP et al. 2008 ; OH et al. 2008). Les CO formés par la voie MUS81, appelée voie II, représentent 10% des CO chez *Arabidopsis* (BERCHOWITZ et al. 2005), 30% chez *S.cerevisiae* (ARGUESO 2004 ; SANTOS et al. 2003).

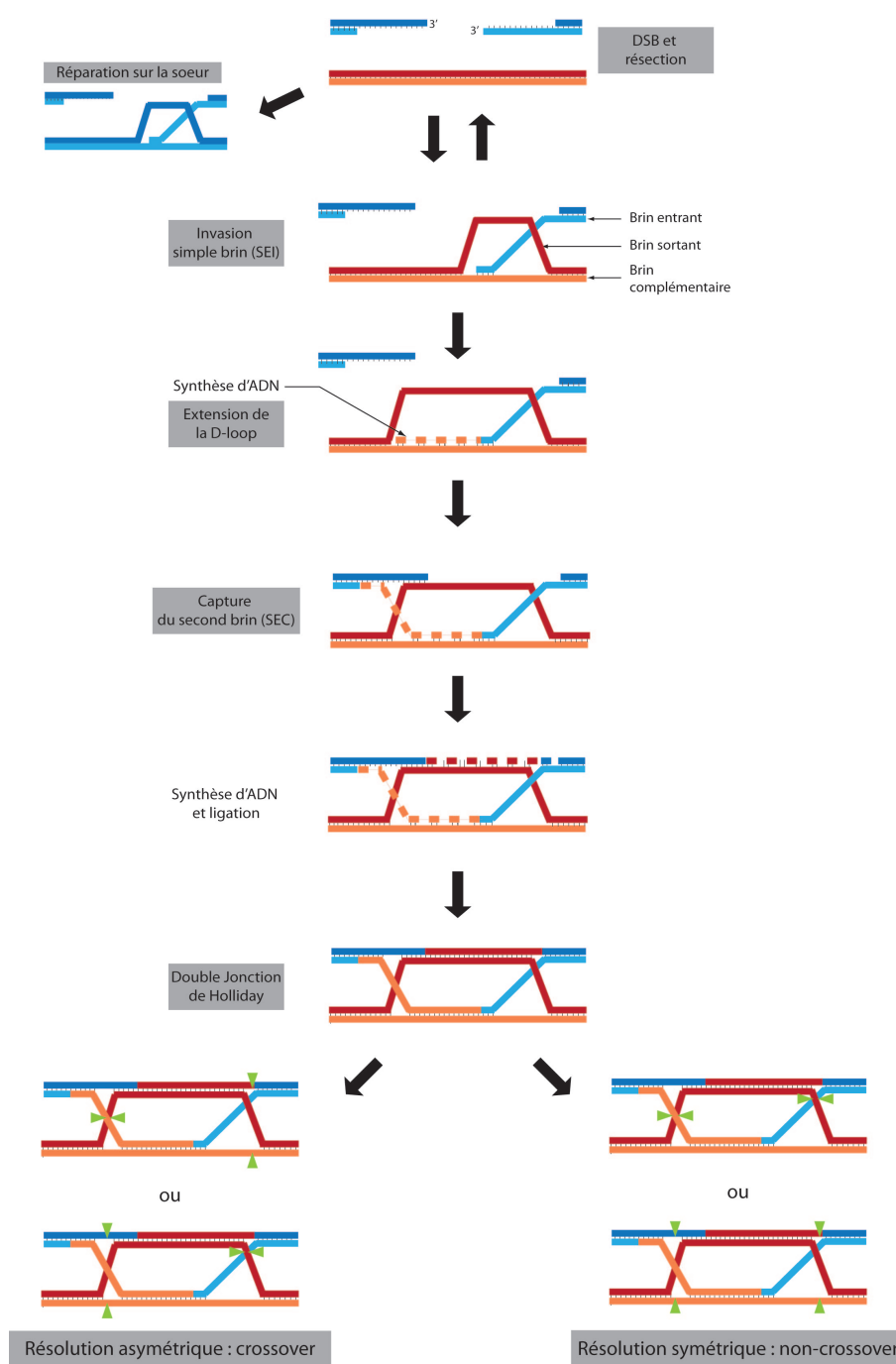


FIGURE 2.5 – **Formation et résolution de la double-jonction de Holliday.** Après l'invasion simple brin (SEI) grâce à l'action combinée de RAD51 et DMC1, la réparation de la cassure commence par une synthèse prolongeant le brin entrant en utilisant le brin complémentaire. La stabilisation complète se fait grâce à la capture du second brin (*second end capture*, SEC) par complémentarité de séquence entre le brin complémentaire et la deuxième extrémité 3' flanquante. Une nouvelle synthèse suivie d'une ligation aboutit à la formation d'une double jonction de Holliday (dHj). La dHj peut alors être résolue de façon symétrique (à droite) qui mène à la formation d'un non-crossover, ou de façon asymétrique, pour mener à la formation d'un crossover.

et la totalité chez *S.pombe* (SMITH et al. 2003).

Chez *Arabidopsis* comme chez *S.cerevisiae*, un double mutant *zmm mus81* n'abolit pas totalement la formation des CO (ARGUESO 2004 et données du laboratoire). Cette donnée implique qu'il puisse exister une troisième voie de formation des CO, au moins active dans ce contexte double mutant. Les facteurs protéiques impliqués dans cette troisième voie putative ne sont pas connus.

2.3.3 Résolution des doubles-jonctions de Holliday et formation des CO de voie I

Les enzymes responsables de la résolution des dHj sont assez bien caractérisées dans le cadre de la recombinaison somatique mais, en méiose, celles impliquées dans la résolution menant aux CO de voie I ne sont pas bien connues. Pour qu'une dHj donne lieu à un CO, il faut qu'elle soit résolue de façon asymétrique ; la résolution symétrique donnant lieu à un NCO (Figure 2.5).

Les protéines MLH1 et MLH3 seraient impliquées dans la résolution spécifiquement asymétriques des dHj pour promouvoir la formation des CO. La protéine MLH1 localise spécifiquement aux sites de crossovers dépendant des ZMM chez *Arabidopsis*, la tomate et la souris (ANDERSON et al. 1999 ; BAKER et al. 1996 ; CHELYSHEVA et al. 2010 ; LHUISSIER et al. 2007). La mutation du gène *MLH1* chez la levure provoque une diminution du nombre de CO de 50 à 70% par rapport au sauvage (ARGUESO 2004 ; HUNTER et al. 1997 ; WANG et al. 1999). Chez *Arabidopsis*, les mutants *mlh1* et *mlh3* présentent une diminution de 60% de la formation des CO, ce qui reste bien inférieur aux 80% observés chez les mutants *zmm* (JACKSON et al. 2006, données du laboratoire). Ces données peuvent suggérer que, une fois les dHj formées, la résolution n'est plus biaisée vers la formation des CO en l'absence de MLH1-MLH3.

Les nucléases responsables de la formation des CO de voie I n'ont pas encore formellement identifiées, mais de nombreuses endonucléases mitotiques pourraient être candidates. Chez la levure, MLH1 et MLH3 fonctionneraient avec l'exonucléase EXO1 dans cette résolution, sans que le mécanisme moléculaire soit élucidé (KEELAGHER et al. 2011 ; ZAKHARYEVICH et al. 2010, 2012). Chez *C.elegans*, MUS-81 mais aussi SLX-1, SLX-4 et XPF-1 sont importantes en méiose pour la résolution des dHj pour former les crossovers de voie I (AGOSTINHO et al. 2013). En mitose, YEN1 (GEN1 chez les mammifères) est capable de cliver les dHj (IP et al. 2008). Les mutants *yen1* de *S.cerevisiae* ne présentent pas de phénotype méiotique, mais le double mutant *yen1 mms4* n'est plus capable de résoudre ses dHj, montrant une certaine redondance entre YEN1 et MUS81 chez cette espèce (DE MUYT et al. 2012 ; IP et al. 2008). Chez les mammifères, le rôle de GEN1

en méiose n'a pas été étudié (SVENDSEN et al. 2010), mais il a été montré que l'expression de la protéine humaine GEN1 pouvait supprimer les défauts d'un mutant *mus81* de *S.cerevisiae* (LORENZ et al. 2010) et pouvait aussi résoudre les dHj de manière non biaisée, menant à la formation de 50% de CO et 50% de NCO (LORENZ et al. 2012). Le complexe SLX1-SLX4 présente une activité de résolution des dHj (entre autres, SVENDSEN et al. 2010). Les homologues de SLX4 sont présents chez de nombreuses espèces : BTB12 chez l'humain, MUS312 chez *D.melanogaster*, HIM-18 chez *C.elegans*, mais aucun homologue stricte n'est identifiable chez *Arabidopsis*. Chez la drosophile, MUS312 est nécessaire à la formation des CO méiotiques (YILDIZ et al. 2002).

Toutes ces données montrent que les résolvases mitotiques sont très probablement impliquées dans la résolution de certaines des dHj méiotiques, bien que leur rôle respectif ne soit pas encore déterminé.

2.3.4 Dynamique de la recombinaison et formation des NCO

Un très grand nombre de précurseurs de recombinaison sont formés et le ratio CO/DSB est souvent très faible, à la notable exception de *C.elegans* qui présente un faible niveau de cassures (DE MUYT et al. 2009; YOUNDS et al. 2011). Il est classiquement accepté que les DSB non réparées en tant que CO seraient réparées en tant que non-crossovers (NCO).

Le modèle original de réparation des DSB par la recombinaison homologue proposait que les CO et les NCO provenaient de la résolution différentielle d'un seul et même intermédiaire de recombinaison, la dHj (SZOSTAK et al. 1983). Cependant, des études moléculaires chez la levure ont pu montrer que, chez cette espèce, les dHj produisaient très majoritairement des CO et une très faible proportion de NCO (ALLERS et al. 2001; BÖRNER et al. 2004). Les mutants *zip1*, *msh4*, *msh5*, *mlh1* et *mer3* de *S.cerevisiae* ne forment plus de dHj et montrent une diminution drastique du taux de CO mais un niveau sauvage de NCO (ALLERS et al. 2001; HOLLINGSWORTH et al. 1995; HUNTER et al. 1997; NAKAGAWA et al. 1999; ROSS-MACDONALD et al. 1994; STORLAZZI et al. 1996; SYM et al. 1993), indiquant que la plupart des NCO ne sont pas dépendants des ZMM chez la levure. Il est aujourd'hui admis que la majorité des NCO est formée par la voie SDSA (MCMAHILL et al. 2007) qui procède à une simple religation après synthèse des extrémités coupées, après invasion et dissolution de la D-loop (Figure 2.4).

Des études de dissection de tétrades de levure ont pu mettre en évidence une grande variété de produits de recombinaison sur un même hotspot, compatible avec l'obtention de NCO aussi bien par la dissolution que par la résolution de dHj ou par SDSA (MARTINI et al. 2011). Des évidences de saut de matrice de réparation (*template switching*)

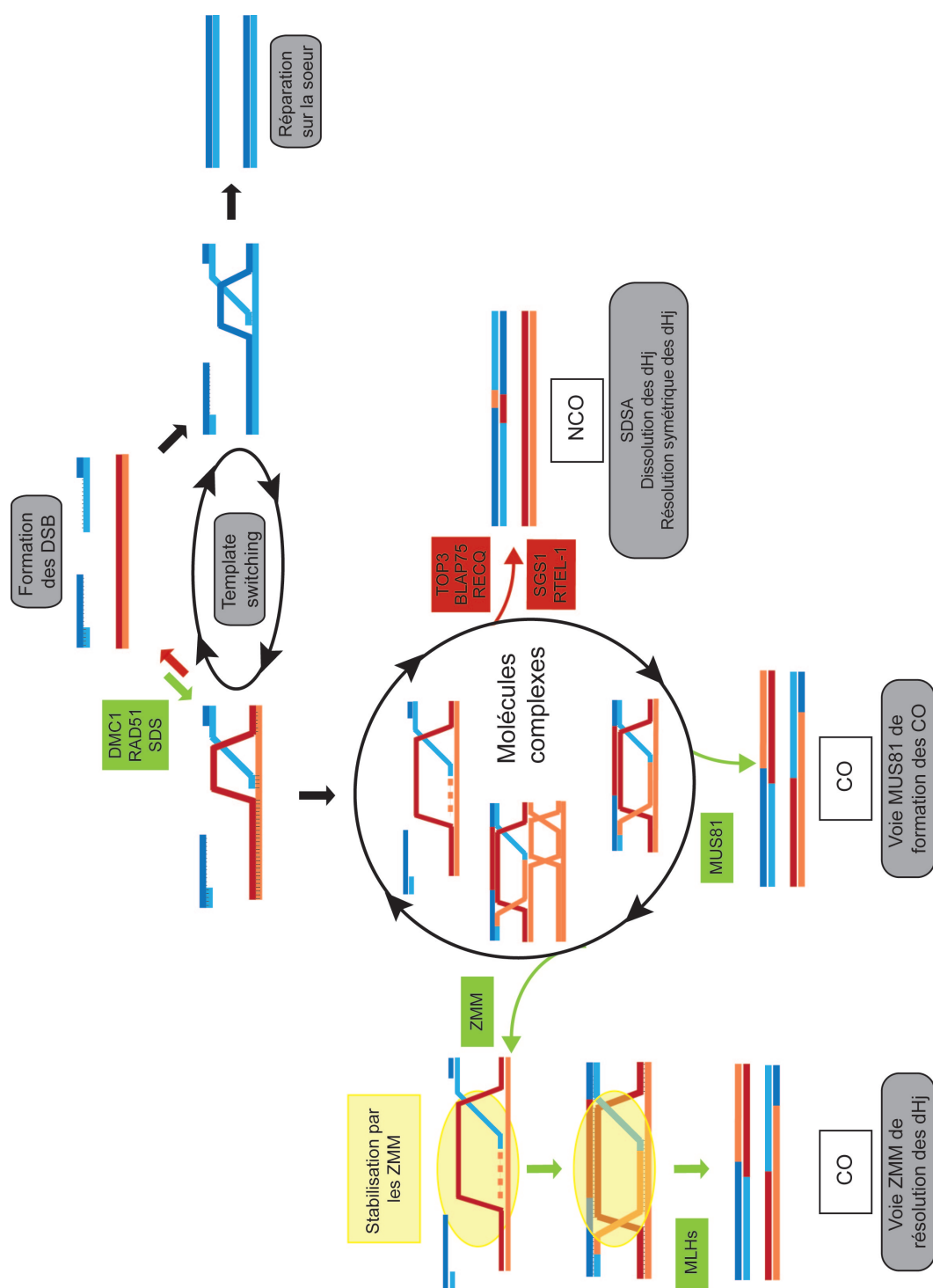


FIGURE 2.6 – La formation des CO et des NCO est dynamique et régulée à de nombreuses étapes. La formation et résolution des intermédiaires de recombinaison est un processus dynamique, et les protéines sont en compétition pour prendre en charge les mêmes intermédiaires. Les flèches et cadres verts indiquent des voies favorisant la formation de CO, contrairement aux rouges. D'après DE MUYT et al. 2012.

provenant d'invasions multiples montrent aussi que les intermédiaires peuvent changer de matrice de réparation au cours de leur réparation (MARTINI et al. 2011).

Ces données montrent que la réparation des cassures double brin n'est pas un processus linéaire bien hiérarchisé, et que si la formation des CO est particulièrement bien régulée (ci-dessus et chapitre suivant), la réparation des DSB non désignées pour être des CO pourraient être prises en charge par un grand nombre de facteurs protéiques pour donner des NCO avec des propriétés très différentes suivant le processus de réparation (Figure 2.4 et 2.6).

2.3.5 Comment reconnaître son chromosome homologue ?

La recherche d'homologie et la stringence dans la définition de l'homologie entre deux séquences sont des processus essentiels lors de la recombinaison. Notamment, il existe des séquences répétées dans les génomes, qui peuvent servir de matrice de réparation pour les DSBs alors qu'elles ne sont pas alléliques (au même locus sur un chromosomes homologue ou une chromatide sœur). Un CO engageant deux séquences non alléliques entraîne des défauts de ségrégation et des translocations (JINKS-ROBERTSON et al. 1986 ; NICOLAS et al. 2007). Les mécanismes de reconnaissance de l'homologie et de l'hétérologie ne sont pas bien connus, mais quelques pistes peuvent être évoquées. L'appariement des chromosomes sur leur longueur, avant la mise en place du synapsis, pourrait notamment être important (HABER 2000).

Lorsque les intermédiaires de recombinaison sont formés, des hétéroduplexes d'ADN présentant des mésappariements peuvent apparaître si les séquences homologues présentent des polymorphismes (SNPs, *single nucléotid polymorphism*, microsatellites – courtes régions répétées différenciellement entre deux fonds génétiques- ou INDELs, *insertions/deletions*). En mitose, ces mésappariements sont reconnus par la machinerie de réparation des mésappariement (*mismatch repair pathway*, MMR) pour être réparés en remplaçant une des deux bases par la base complémentaire du deuxième brin. Chez *S.cerevisiae*, la formation de ces hétéroduplexes (hDNA) est dépendante de la divergence des séquences : plus les séquences sont éloignées, moins de hDNA seront formés (CHEN et al. 1999). MSH2 est une des protéines du MMR, capable de reconnaître un large spectre de mésappariements. Sa mutation n'entraîne pas de défaut de recombinaison méiotique dans les lignées isogéniques de levure (100% homozygotes) (HUNTER et al. 1997). Par contre, dans des lignées présentant 0,7% de divergence entre les chromosomes homologues (croisement entre SK1 et S288C), la mutation de *MSH2* entraîne une augmentation de 20% de formation des CO par rapport au sauvage (MARTINI et al. 2011). Ce résultat montre que, chez le sau-

vage, la formation des CO est limitée par MSH2. Le MMR serait donc important pour repérer le polymorphisme et limiter les CO dans les séquences divergentes en redirigeant les intermédiaires vers la chromatide sœur. Le MMR est donc un système de surveillance local du niveau d'hétérologie, qui permet de limiter les événements de recombinaison entre séquences divergentes.

Il existerait donc des mécanismes pour réguler la formation des CO entre séquences trop divergentes, soit que ces séquences sont présentes du polymorphisme, soit parce qu'elles ne sont pas alléliques (séquences répétées dans le génome). Ces mécanismes ne sont pas encore bien connus, mais il est clair que cette régulation est fondamentale au bon déroulement de la méiose.

2.3.6 Comment différencier son chromosome homologue de son homéologue ?

La formation des CO dans les espèces polyploïdes représente un défi important : la présence de chromosomes homéologues, en plus des chromosomes homologues, chez les allo-polyploïdes implique une régulation supplémentaire dans le choix de la matrice de réparation des DSB. Chez de nouveaux allo-tétraploïdes de synthèse, les chromosomes homologues et homéologues recombinent entre eux, formant des multivalents délétères pour la ségrégation des chromosomes en première division (GRANDONT et al. 2013). À l'inverse, tous les allo-polyploïdes stables ont une méiose régulière et tous les CO sont formés entre strictement entre chromosomes homologues. L'obtention d'une méiose régulière est indispensable à la survie du polyploïde et à sa propagation, et est donc sous pression de sélection très importante. Chez le blé et le colza, deux loci impliqués pour la régulation de la recombinaison homéologue ont été mis en évidence en 2006, nommés PH1 et PrBn respectivement (GRIFFITHS et al. 2006 ; LIU et al. 2006). Les gènes spécifiquement impliqués dans la régulation de la recombinaison au sein de ces loci ont été identifiés, mais la validation fonctionnelle reste compliquée. Le locus PH1 contient un cluster de gènes homologues à des kinases dépendantes de cyclines (CDK, *cyclin dependent kinase*), proches de la protéine humaine CDK2, qui régule l'expression de gènes méiotiques (YOUSAFZAI et al. 2010). Le locus PrBn contient des gènes méiotiques candidats, mais aucun n'a été confirmé pour le moment (données personnelles, Aurélien Blary et Eric Jenczewski). Ces données montrent que la régulation de la recombinaison d'homologie est contrôlée génétiquement, et la caractérisation de ces mécanismes reste un enjeu majeur dans le cadre de l'amélioration végétale et la sélection variétale.

Ces résultats montrent qu'ils existent des mécanismes de reconnaissance de l'homologie à l'échelle du chromosome, qui permettent aux événements de recombinaison de se limiter à des échanges alléliques entre chromosomes homologues.

Régulation des événements de crossovers

Le nombre de précurseurs de recombinaison est bien supérieur au nombre d'événements de crossovers : chez *Arabidopsis* on compte par exemple 250 à 300 foyers DMC1 pour 10 crossovers (Chapitre 1). Cette observation, et celles qui seront évoquées dans ce chapitre, soutiennent l'hypothèse qu'il existe des mécanismes actifs pour limiter la formation des crossovers en méiose. D'autre part, la formation des CO est aussi contrôlée spatialement, et je m'attarderai sur la description du phénomène d'interférence (page 55), puis aborderai des pistes moléculaires possibles pour limiter la formation des crossovers en méiose (page 64).

3.1 Observations génétiques et cytologiques

3.1.1 Le crossover obligatoire

Les crossovers sont essentiels à la bonne disjonction des chromosomes homologues en première division de méiose, comme cela a été évoqué (1.1.2). Cette nécessité se traduit par une proportion de bivalents en métaphase très proche de 100% chez les espèces qui dépendent des CO pour ségréger leurs chromosomes (BAUDAT et al. 2013 ; BÖRNER et al. 2004 ; CRISMANI et al. 2012 ; YOKOO et al. 2012 ; ZICKLER 2006). Ce phénomène est appelé **crossover obligatoire**. Les marqueurs cytologiques de la voie I de formation des crossovers indiquent que le crossover obligatoire serait sous dépendance des ZMM. Chez *S.cerevisiae*, les chromosomes IV et XV présentent moins de 10^{-3} bivalents sans foyers ZIP3 et seul le petit chromosome III présente 1% de bivalents sans foyers ZIP3 (ZHANG et al. 2014a). Chez *C.elegans*, un foyer COSA-1 est formé sur chaque paire de bivalent (YOKOO et al. 2012), et chez *Arabidopsis* ainsi que chez la souris et *S.macrospora*, chaque bivalent est marqué par au moins un foyer MLH1 ou HEI10 (CHELYSHEVA et al. 2010 ; DE MUYT et al. 2014 ; MARCON et al. 2003). Les cartes génétiques des chromosomes d'espèces très différentes viennent appuyer les observations cytologiques et montrent que

tous les chromosomes portent au moins un CO par méiose (Figure 3.1).

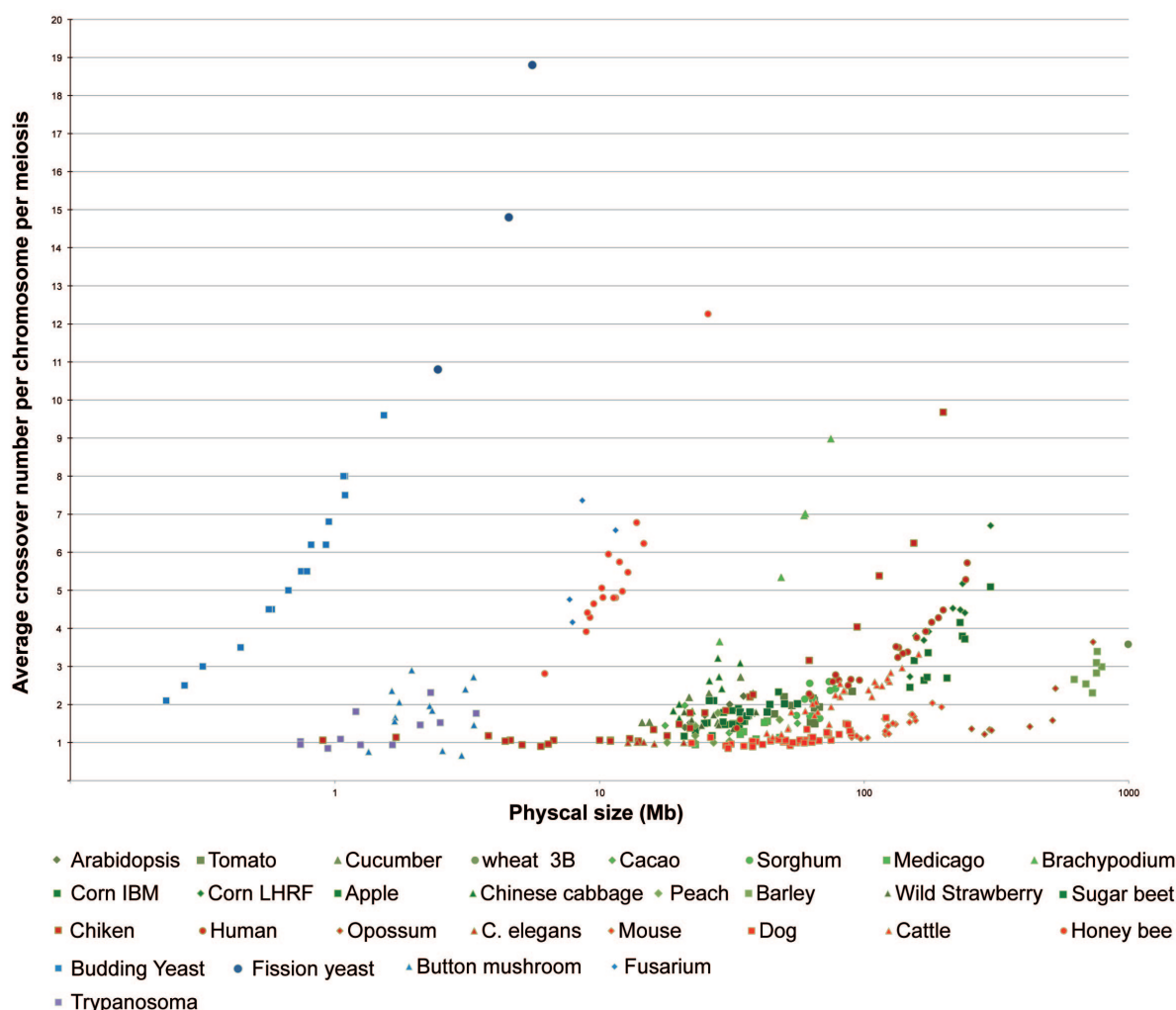


FIGURE 3.1 – Cartes génétiques des chromosomes d’une sélection d’espèces de plantes, d’animaux et de champignons montrant génétiquement l’existence d’un CO obligatoire et une limitation du nombre de CO par chromosome : par exemple, 75% des chromosomes portés sur ce graphe présentent moins de 3 CO, et ce quelle que soit l’espèce et quelle que soit la taille du chromosome, qui peut varier d’un facteur 1 000. Données personnelles, Raphaël Mercier.

3.1.2 Une limitation du nombre de CO par chromosome et par cellule

A l’inverse, le nombre de CO, mesuré cytologiquement (ci-dessus) ou génétiquement (Figure 3.1), reste souvent proche du seul CO obligatoire par chromosome : par exemple,

75% des chromosomes représentés sur la Figure 3.1 portent entre 1 et 3 CO par méiose, toutes espèces confondues. Cette observation est à mettre en regard de la taille des chromosomes, qui elle peut varier de plusieurs ordres de grandeur (par exemple le chromosome 4 du trypanosome – 1.05 Mb - et le chromosome 15 de la souris – 103 Mb – mesurent respectivement 1.09cM et en moyenne 1.13cM, COOPER et al. 2008 ; COX et al. 2009). Ces observations suggèrent que le nombre de CO par chromosome est limité.

Au sein de chaque espèce, une corrélation entre la taille des chromosomes et la taille des chromosomes est néanmoins observable (Figure 3.2) : le plus petit chromosome de chaque génome ; quelque soit sa taille, porte toujours au moins un CO (et mesure donc au moins 50cM), et le nombre de CO augmente linéairement avec la taille du chromosome à partir d'une taille critique. Ces données suggèrent que les mécanismes régulant le nombre de CO, bien que conservés dans l'arbre du vivant, se sont adaptés à chaque population de chromosomes, pour limiter le nombre de CO par chromosome quelle que soit sa taille tout en garantissant le CO obligatoire.

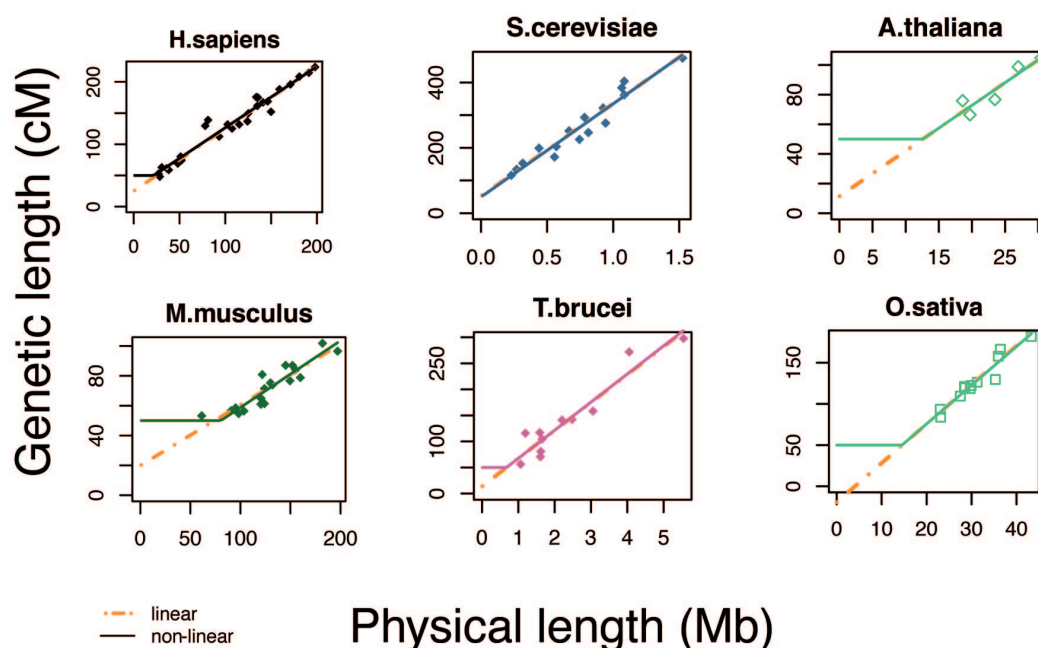


FIGURE 3.2 – Nombre de CO par chromosome dans une sélection d'espèce. Des régressions linéaires (pointillés) et non linéaires (traits pleins) sont proposées pour chaque nuage de points. Adapté d'après les résultats de la thèse d'A. Popa, <http://hal.inria.fr/tel-00750370/>.

Un contrôle plus global du nombre de CO par cellule semble aussi actif, au moins chez *Arabidopsis*. Les mutants *axr1* et *pss1* d'*Arabidopsis* montrent tous les deux un nombre de CO marqués par MLH1 inaltéré par rapport au sauvage, mais un nombre

d'univalents élevé. Dans les deux cas, une délocalisation des CO de voie I dans des régions confinées du génome est observable : les foyers MLH1 apparaissent en grappes sur des petites régions chromosomiques au lieu d'être répartis de manière homogène sur les 5 paires (« PSS1 (article en cours de révision) » ; « AXR1 (Article sous presse) », en revue). Ces deux mutants sont des exemples uniques de délocalisation des CO de voie I, et leur phénotype original suggère qu'il existe une régulation du nombre de CO à l'échelle de la cellule : chaque méiocyte forme en moyenne une dizaine de foyers MLH1, où qu'ils soient placés et même si le CO obligatoire n'est pas assuré. AXR1 est une protéine de la voie de neddylation/RUBylation qui, comme l'ubiquitination ou la SUMOylation, permet une régulation post-traductionnelle des protéines. PSS1 est une kinésine cytoplasmique dont l'activité motrice (qui permet classiquement aux kinésines de se déplacer le long des microtubules) est essentielle à son activité méiotique. Ces deux mutants mettent en lumière deux nouveaux aspects de la régulation de la formation des CO de voie I : l'importance de la neddylation et du mouvement des chromosomes en prophase de méiose pour la distribution des événements de crossovers à l'échelle du génome.

3.1.2.1 L'interférence : observations cytologiques et génétiques

La répartition des CO n'est pas aléatoire dans le génome, mais soumise à l'interférence. La première observation de l'interférence fut effectuée il y a 101 ans, par Alfred Sturtevant (21 Novembre 1891 – 5 Avril 1970) qui effectuait alors sa thèse chez Thomas Hunt Morgan (25 Septembre 1866 - 4 Décembre 1945). Sturtevant est le premier à compiler des données de ségrégation de marqueurs multiples pour établir la première carte génétique. Il étudie notamment la ségrégation de trois marqueurs liés : B (affectant la couleur du corps de la mouche), CO (affectant la couleur des yeux) et R (responsable des ailes vestigiales). En effectuant la première carte génétique, il remarque alors (STURTEVANT 1913) :

Des doubles crossovers apparaissent entre ces trois marqueurs, mais il faut noter que la présence d'une rupture de liaison entre B et CO a tendance à empêcher celle entre CO et R (et *vice versa*).

C'est encore aujourd'hui la terminologie employée pour définir l'interférence : la présence d'un CO empêche la formation d'un deuxième CO à proximité. Cette interférence est facteur de la distance génétique entre les marqueurs : plus les marqueurs sont éloignés plus la fréquence de double crossover est proche de l'attendue (STURTEVANT 1913).

Cette découverte fut maintes fois confirmée, et la grande majorité des espèces à reproduction sexuée montrent de l'interférence, à l'exception de quelques espèces comme *S.pombe* et *A.nidulans* (MUNZ 1994; ZICKLER et al. 1999). Les foyers MLH1, HEI10, ZIP3 ou COSA-1 mis en évidence sur les chromosomes de tomate, la levure, *Sordaria*,

C.elegans ainsi que chez l'humain montrent de l'interférence, démontrant cytologiquement l'existence de ce mécanisme (ANDERSON et al. 1999 ; CHELYSHEVA et al. 2010 ; DE MUYT et al. 2014 ; YOKOO et al. 2012 ; ZHANG et al. 2014a). La force de l'interférence peut se définir comme la distance (génétique ou physique) sur laquelle joue l'interférence, c'est à dire la distance à partir de laquelle un deuxième crossover sensible à l'interférence peut se produire. Si l'interférence est un phénomène quasi universel chez les organismes à reproduction sexuée, sa force varie d'une espèce à l'autre. Chez *Arabidopsis* ou *Mus musculus*, plusieurs foyers MLH1 peuvent être présents sur le même chromosome (ANDERSON et al. 1999 ; CHELYSHEVA et al. 2007), tout comme chez *S.cerevisiae* avec plusieurs foyers ZIP3 (ZHANG et al. 2014a), alors que chez *C.elegans* on dit que l'interférence est complète : chaque paire de chromosomes reçoit en tout et pour tout un seul et unique foyer COSA-1 par méiose (YOKOO et al. 2012). Des expériences de fusion de chromosome chez cette espèce ont même montré que le signal d'interférence pouvait se propager sur une distance équivalente à la moitié du génome complet de *C.elegans* (HILLERS et al. 2003).

Les crossovers de voie I dépendant des ZMM sont sensibles à l'interférence, tandis que les crossovers de voie II dépendant de MUS81 ne le sont pas. Cette donnée est appuyée par des observations cytologiques chez de nombreuses espèces (ci-dessus), et par des analyses génétiques et mathématiques (BERCHOWITZ et al. 2005 ; FALQUE et al. 2007, 2010 ; MERCIER et al. 2008 ; STAHL 2008 ; STAHL et al. 2010).

Quelle est la nature du signal d'interférence, comment se propage-t-il et quels sont les modulateurs de l'interférence sont autant de questions qui restent encore aujourd'hui ouvertes, 100 ans après la première mise en évidence du phénomène.

3.2 L'interférence des crossovers : mesures et modèles

3.2.1 Comment mesurer l'interférence ?

Avant de mesurer l'interférence, il faut évaluer la taille génétique des intervalles qui nous intéressent. La définition première développée par Morgan de la distance génétique en centiMorgan entre deux marqueurs correspond à la fréquence de recombinants dans une population ; ainsi pour deux caractères non liés, la probabilité que ces deux caractères soient associés dans un gamète est de 50% (une chance sur deux) et la distance génétique pour deux caractères non liés est de 50cM (MORGAN 1912). Pour des caractères liés, la proportion de recombinants est inférieure à 50%. L'hypothèse sous-jacente de Morgan dans cette définition est que l'interférence est complète et qu'aucun double-CO ne se forme

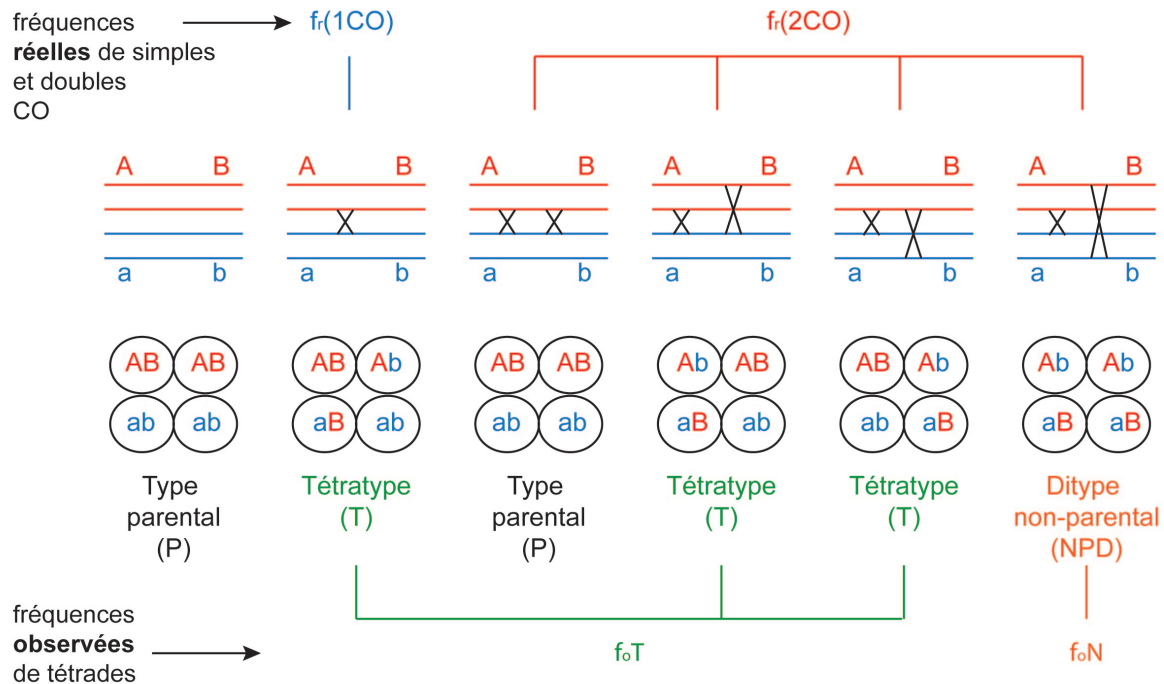
sur l'intervalle considéré.

Haldane introduit en 1919 la possibilité que ces doubles événements puissent se produire (HALDANE 1919). Il infère alors que la probabilité d'avoir un double CO est le carré de celle d'avoir un simple CO (pour 10% de simple CO observés, la fréquence de double-CO est de 1%), c'est-à-dire que la présence d'un CO n'empêche pas la formation d'un deuxième, et qu'il n'y aucune interférence. Là aussi, cette mesure s'éloigne de la réalité.

Kosambi propose alors en 1943 de prendre en compte l'interférence dans le calcul de la distance génétique d'un intervalle (KOSAMBI 1943). Il utilise pour cela la variable c de *coïncidence* créée par Muller (MULLER 1916) : prenons trois marqueurs (appelons les A, B et C), c est alors définie comme la fréquence de double-CO observés entre A et C rapportée au nombre attendu, obtenu par le produit des fréquences observées dans les intervalles A-B et B-C. Ce paramètre c donne une mesure de l'interférence (c'est en fait le CoC, voir ci-dessous). Lors du calcul de la distance d'un intervalle (délimité par seulement deux marqueurs), il faut alors estimer la valeur de c , or aucune valeur universelle n'existe. Kosambi a donc estimé la valeur de c chez l'homme et c'est cette valeur qui est utilisée dans son modèle. Pour les autres espèces, des modèles ont été développés pour évaluer la valeur de c d'après les données expérimentales (MCPEEK et al. 1995). Le modèle de Kosambi est donc identique au modèle de Morgan pour $c=0$ (aucune interférence), et identique à celui de Haldane pour $c=1$ (interférence complète).

Ces développements théoriques permettent de préciser la notion de centiMorgan. Contrairement à ce qui est souvent conceptualisé, un centiMorgan *ne correspond pas* à 1% de recombinaison. Même si ces deux quantités sont très proches, l'égalité n'est pas légitime. En réalité, le centiMorgan pourrait être défini comme la distance séparant deux loci entre lesquels *l'espérance du nombre de CO est de un centième* (VIENNE 1998).

L'étude de la recombinaison en utilisant des tétrades de spores, qui contiennent les quatre résultats d'une même méiose, a permis d'améliorer le calcul de la distance génétique. Parce que l'on a accès aux quatre produits d'une même méiose, la quantité d'information disponible est démultipliée. L'équation de Perkins (Figure 3.3) permet d'estimer la distance génétique d'après le comptage de tétrades recombinantes entre deux marqueurs en prenant en compte les événements de double-CO visibles (qui donnent lieu à des tétrades dites "ditypes non-parentaux") pour corriger le nombre de double-CO invisibles (qui donnent lieu à des "tétratypés" ou des tétrades "parentales") (PERKINS 1949). Cette équation est explicitée sur la Figure 3.3. Deux hypothèses sont importantes pour pouvoir appliquer cette équation : (i) les événements de triple CO sont négligeables, et négligés ; (ii) il n'y a pas de biais dans le choix des chromatides recombinées, i.e le choix des chromatides impliquées dans la formation d'un crossover n'est pas influencé par la présence d'un autre crossover dans le même intervalle.



L'occurrence de 2 CO dans l'intervalle mène à la formation de $\frac{1}{4}$ NPD + $\frac{1}{2}$ T + $\frac{1}{4}$ P
donc la fréquence de tétrades NPD observée ne reflète qu'un quart des événements de doubles CO :
 $f_r(2CO) = 4 \times f_oN$

Parmi les Tétratypes, il y a des tétrades ayant subi 2 CO dans l'intervalle : il y a exactement $2 \times f_oN$ tétrades qui ont subi 2 CO et qui apparaissent comme T :
 $f_r(1CO) = f_oT - 2 f_oN$

La fréquence d'événements de crossovers par **tétrade** est : $F = f_r(1CO) + 2 \times f_r(2CO)$

$$F = f_oT - 2 f_oN + 2 \times (4 f_oN)$$

$$F = f_oT + 6 f_oN \quad \text{Equation de Perkins}$$

La distance génétique est la fréquence d'événements de crossovers par **gamète** (ou par chromatide)

$$D = \frac{1}{2} F \text{ en Morgans}$$

$$D = \frac{1}{2} F \times 100 \text{ en cM}$$

$$D = 50 \times F \text{ en centiMorgans}$$

$$D = 50 (f_oT + 6f_oN) \text{ cM}$$

FIGURE 3.3 – **L'équation de Perkins** permet de mesurer la taille génétique d'un intervalle à partir de données de tétrades recombinantes. La ségrégation de deux marqueurs (A et B, avec leurs allèles a et b) permet de différencier seulement 3 types de tétrades : les parentales (P, qui ont la même composition de marqueurs que les parents, soit ab ou AB); les tétratypés (T) qui ont deux gamètes parentaux (AB et ab) et deux gamètes recombinants (Ab et aB); et les ditypes non parentaux (*non-parental ditype*, NPD) dont les quatre gamètes sont recombinés. Perkins corrige de façon empirique les fréquences de simples et doubles CO pour tenir compte des doubles événements qu'on ne peut pas voir dans le résultat final.

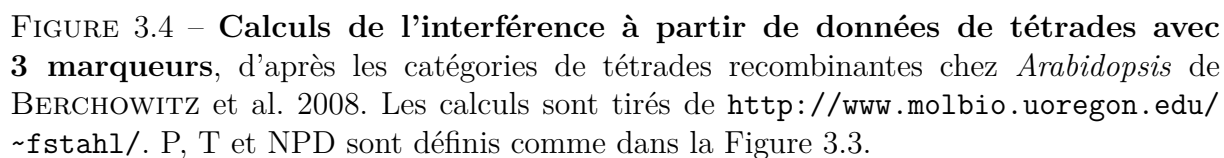
L'interférence peut se mesurer lorsque l'on dispose de données de ségrégation sur deux intervalles mitoyens, comme c'est le cas dans l'expérience de Sturtevant ou dans des systèmes d'analyse de tétrades de levures, ou les tétrades fluorescentes (*fluorescent tagged lines*, FTL) développé par Gregory Copenhaver chez *Arabidopsis* (BERCHOWITZ et al. 2008 ; Figure 3.4). Plusieurs indices mesurant l'interférence ont été développés. Les plus usités sont le coefficient de coïncidence (*Coefficient of coincidence*, CoC) et le ratio d'interférence (*interference ratio*, IR). Ils sont explicités dans la Figure 3.4.

Le ratio d'interférence (*interference ratio*, IR) développé par Muller (MULLER 1916) répond à la question : est-ce que la distance génétique de l'intervalle 1 (I1) est affectée par la présence d'un CO dans l'intervalle 2 (I2) ? S'il n'y a pas d'interférence, la taille de I1 devrait être la même qu'il y ait ou non un CO dans I2, et $IR = 1$. On peut utiliser un test de χ^2 pour tester si les deux distances sont statistiquement différentes, et par corollaire si $IR=1$, et ainsi détecter l'interférence.

Le coefficient de coïncidence (*coefficient of coincidence*, CoC) répond à la question : est-ce que le nombre de doubles CO entre les deux marqueurs les plus distants (avec au moins un CO dans chaque intervalle) est égal à l'attendu (produit des fréquences de chacun des deux intervalles) ? S'il n'y a pas d'interférence, la fréquence de double crossovers doit être égale au produit des fréquences de CO dans I1 et dans I2, et le $CoC = 1$. Ici un test de χ^2 permet de dire si les fréquences attendues et observées sont statistiquement différentes (donc tester si $CoC=1$) pour détecter l'interférence.

3.2.2 Des mutants affectés dans l'interférence ?

Comment détecter des mutants affectés dans l'interférence, et comment déterminer si les mécanismes de l'interférence sont touchés ? L'étude de l'interférence par des expériences génétiques est souvent compliquée, notamment à cause de la présence des crossovers de voie II, qui ne sont pas sensibles à l'interférence et qui diluent le signal. Par exemple, une réduction apparente de l'interférence peut simplement refléter un déficit en CO de voie I, ou une augmentation du nombre de CO de voie II, alors que les mécanismes de l'interférence ne sont dans aucun cas affectés (BERCHOWITZ et al. 2005 ; LIBUDA et al. 2013). Les marqueurs cytologiques indiquant spécifiquement la position des CO interférents sont donc primordiaux pour l'étude des dysfonctionnements de l'interférence, comme ZIP-3, HEI10, MLH1 ou COSA-1 (DE MUYT et al. 2014 ; MARCON et al. 2003 ; YOKOO et al. 2012 ; ZHANG et al. 2014a). La distance entre ces foyers permet d'estimer la force de l'interférence. Nancy Kleckner a récemment proposé l'utilisation d'une métrique descriptive de la force de l'interférence, en μm de SC (ZHANG et al. 2014a,b) : la variable L (en μm) permet de décrire la distance à laquelle l'interférence peut exercer son influence.



Le principe est de mesurer le CoC entre deux intervalles, de plus en plus éloignés. Si les intervalles sont assez éloignés, les CO apparaissent indépendamment les uns des autres dans ces deux intervalles, et le $\text{CoC} = 1$. L'indicateur L_{CoC} est la distance L entre deux intervalles dont le $\text{CoC} = 0.5$. Cet indicateur pourrait être très pertinent pour comparer les différents effets des mutations testées (ZHANG et al. 2014a,b).

Aujourd'hui, les seuls mutants chez qui l'interférence semble réellement perturbée sont les mutants RNAi contre les éléments du complexe synaptonémal chez *C.elegans* et un mutant de topoisomérase chez *S.cerevisiae* (LIBUDA et al. 2013 ; ZHANG et al. 2014b).

La diminution partielle de l'expression des protéines SYP-1, SYP-2 ou SYP-3, trois protéines de l'élément central du SC de *C.elegans*, par interférence ARN (RNAi) augmente le nombre de foyers COSA-1 qui est normalement strictement restreint à 1 par chromosome chez le sauvage (LIBUDA et al. 2013). L'effet est encore plus flagrant sur le chromosome artificiel *mnT12* issu de la fusion du chromosome sexuel (X) et du chromosome 4. Chez le sauvage, *mnT12* présente entre 1 et 2 foyers COSA-1, et dans les cas où 2 foyers sont formés, ils se trouvent toujours en position distale (distance maximale entre les deux foyers). Chez le mutant RNAi *syp-1*, le chromosome *mnT12* peut présenter jusqu'à quatre foyers, mais surtout, ces quatre foyers sont répartis aléatoirement le long du chromosome sans apparente régulation. Dans ce contexte, le CoC s'approche de 1 pour des intervalles très proches, contrairement au sauvage (la L_{CoC} , bien que non calculée dans cet article, doit donc être très faible).

Même chez *C.elegans* où seule la voie ZMM semble être requise pour former les CO, les essais génétiques pour étudier les perturbations des mécanismes d'interférence ne sont pas forcément les plus adaptés. En effet, le mutant *rtel-1* montre une augmentation du nombre de CO (YOUDES et al. 2010) qui, chez cette espèce, pourrait être interprétée comme une perturbation de l'interférence complète. Mais les extra-CO formés dans ce mutant, s'ils dépendent des ZMM, ne sont en majorité par marqués par ZHP-3 (une protéine ZMM, YOUDES et al. 2010), ni COSA-1 (YOKOO et al. 2012). Il est donc très probable que ce mutant ne perturbe pas l'interférence (voir aussi ci-dessous la section 3.3).

Chez la levure, le marquage ZIP3 permet de marquer les crossovers de voie I (ZHANG et al. 2014b). Ce marquage permet d'estimer la L_{CoC} et d'étudier les mécanismes de l'interférence. Dans un mutant *topo2* méiose spécifique (mutant nul complété par une version exprimée uniquement en mitose mais pas en méiose), la L_{CoC} est diminuée par rapport au sauvage (ZHANG et al. 2014b). TOPO2 est un topoisomérase de classe II, une classe de protéines impliquées dans la condensation des chromosomes, dans la résolution des *interlocks* des chromosomes nouvellement répliqués et dans le débobinage des super structures de l'ADN (BERGER et al. 1996). TOPO2 serait donc importante pour garantir le phénomène d'interférence chez *S.cerevisiae*. Dans la même étude, les auteurs

ont aussi étudié d'autres mutants qui pourraient être impliqués dans les mécanismes de l'interférence : le mutant d'AAA-ATPase *pch2* impliqué dans la régulation du synpasis (voir 5.2.2), le mutant de la protéine de l'élément central du complexe synaptonémal *zip1*, le mutant défectueux dans le mouvement des chromosomes en méiose *ndj1*, le mutant de l'hélicase homologue à FANCM chez *S.cerevisiae* *mph1*, le mutant *zmm msh4*, le mutant *mlh1*, et le mutant de la protéine de la machinerie de réparation des mésappariements *msh2*. Aucun de ces mutants ne montrent de défaut d'interférence, et leur L_{CoC} est similaire à celle du sauvage. Ces protéines ne sont donc pas impliquées dans la régulation de l'interférence chez *S.cerevisiae*.

Le mutant *axr1* d'*Arabidopsis* présente une délocalisation des foyers MLH1 (ci-dessus). Malgré cette délocalisation, il a été montré que les foyers formés présentent toujours de l'interférence : les foyers MLH1 et HEI10 sont toujours régulièrement espacés (plus régulièrement qu'attendu par hasard) sur la portion de synapse où ils sont formés. Ce mutant n'est donc pas un mutant d'interférence (« AXR1 (Article sous presse) », sous presse).

3.2.3 Comment est implémentée l'interférence ?

La décision de former un CO ou un NCO semblerait être très précoce, avant la mise en place du SC et bien avant la formation des dHj, peut-être au moment de la SEI (BISHOP et al. 2004 ; HUNTER et al. 2001). La distribution des événements de crossovers proviendrait de l'implémentation de cette décision, qui elle résulte de l'intégration de multiples niveaux de régulation. En effet, les intermédiaires précoces de formation des CO montrent souvent une faible interférence, qui s'intensifie jusqu'à la résolution des CO : les foyers MSH4 précoces de souris sont moins interférents que les foyers MLH1 (BOER et al. 2006b) et la dynamique de formation et disparition des foyers HEI10 suggère aussi une sélection spatio-temporelle progressive des sites de désignations (CHELYSHEVA et al. 2012 ; DE MUYT et al. 2014, (voir 1.2.4.2). Ces données soutiennent un modèle dans lequel les sites de désignation de CO sont choisis assez précocement, convertissant alors les autres sites en NCO, mais que l'implémentation de cette décision se fait progressivement

3.2.4 Les modèles de l'interférence

Quel pourrait être le mécanisme et le signal de l'interférence ? Différents modèles ont été développés pour essayer de répondre à cette question, avec plus ou moins de réussite.

Un modèle pragmatique, appelé **counting model**, propose que chaque CO soit séparé par un nombre fixe de NCO, qui seraient "comptés". Ce modèle ne s'adapte malheureu-

sement pas très bien aux données de recombinaison chez *S.cerevisiae* ou chez l'Homme (FOSS et al. 1995). Une version de ce modèle où les NCO et les CO non interférents seraient comptés a rencontré plus de succès (STAHL 2004). Une grande limitation de ce modèle réside en effet dans l'élément compté : le plus évident serait que les DSB soient comptées, certaines étant désignées pour former un CO interférent toutes les m DSB, qui donneraient elles les NCO et les CO non interférents. Cette hypothèse a été mise à mal par la découverte de l'homéostasie des CO (MARTINI et al. 2006) qui implique que le nombre de CO est assuré même quand le nombre de DSB est limitant. Ce modèle n'explique pas non plus très bien les variations de force de l'interférence le long des chromosomes, comme cela a pu être démontré chez le blé (SAINTENAC et al. 2008).

L'idée que l'interférence est un signal qui doit être transduit le long du chromosome a fait émerger l'idée du **modèle par polymérisation** (KING et al. 1990). Ce modèle implique que lorsqu'un CO est formé, la polymérisation bidirectionnelle d'un signal empêcherait la formation des CO à proximité. La nature de ce signal n'a pas été élucidée, et pourrait aussi bien être supporté par la polymérisation du SC, des modifications post-traductionnelles des protéines de l'axe ou de la structure des chromosomes (phosphorylation, méthylation, SUMOylation...). L'idée que le SC serve de support pour l'interférence était attrayante : *S.pombe* et *A.nidulans* ne forment pas de SC et leurs CO ne sont pas sensibles à l'interférence (ZICKLER et al. 1999). Mais des contre-arguments sont vite apparus : l'extension du synapsis n'est pas nécessaire à l'implémentation de l'interférence chez *S.cerevisiae* (SHINOHARA et al. 2008) et les mutants de souris ayant un SC défectueux présentent une interférence identique au sauvage (BOER et al. 2006a). De plus, chez *D.melanogaster* et *C.elegans*, le SC semble être complet avant la formation des DSB (DERNBURG et al. 1998). Mais les données récentes sur l'implication de SYP-1 dans la régulation de l'interférence chez *C.elegans* (LIBUDA et al. 2013) pourraient peut-être redorer le blason du modèle par polymérisation (voir aussi ci-dessous).

Les premières études de l'interférence avaient fait suggérer à Muller que l'interférence pouvait avoir une base physique : la rigidité des chromosomes en méiose pourrait rendre difficile la formation de deux échanges proches l'un de l'autre (MULLER 1916). Ces considérations ont fait émerger un **modèle de stress mécanique** dans lequel les chromosomes seraient sous tension (*stress*) à cause de l'arrangement de la chromatine autour d'un squelette protéique et de la succession de condensations-décondensations. La formation d'un CO provoquerait le relâchement de cette tension, et comme dans n'importe quel autre modèle physique, ce relâchement se propagerait le long du chromosome (KLECKNER et al. 2004). Ce modèle s'adapte très bien aux données expérimentales, et permet d'expliquer simplement des phénomènes comme le CO obligatoire (la tension mène forcément à une rupture, le CO) et l'homéostasie des CO (quel que soit le nombre d'intermédiaires pré-

coces, la tension reste la même) (ZHANG et al. 2014b). Ce modèle n'a malheureusement pas une grande puissance prédictive et n'est pas facilement testable. La nature du stress, et comment il est implémenté, restent encore de grandes inconnues. Le complexe synaptonémal pourrait être le vecteur de cette tension, et des modifications de la composition du SC pourrait modifier la tension ou au moins dissiper un signal structural empêchant la formation d'autres CO à proximité, comme cela a été montré chez *C.elegans* (LIBUDA et al. 2013). L'échange des axes à l'endroit du crossover pourrait notamment provoquer la rupture du stress.

D'autres modèles plus anecdotiques ont été proposés, comme le modèle de "déterminisme des chiasma" où un module se déplacerait le long des chromosomes de façon unidirectionnelle et provoquerait la formation des CO de façon aléatoire. L'implémentation de l'interférence serait due à un temps de rechargement du module, à l'image d'une arme à feu qui devrait changer ses cartouches, tout en continuant à avancer (FOX 1973).

L'idée générale qui se dégage de tous ces modèles est que : (i) la structure des chromosomes est importante, aussi bien dans le modèle par polymérisation que dans le modèle de stress mécanique ; (ii) le signal d'interférence pourrait être d'ordre "biologique" (modification des protéines) ou physique, mais n'a pas formellement été identifié ; (iii) tous ces modèles cherchent une universalité dans leur mécanisme, qui pourrait s'affranchir des différences entre les espèces (importance du SC, arrangement de la chromatine, partenaires protéiques différents...), ce qui imposent de faire des hypothèses testables chez toutes les espèces.

3.3 Des protéines anti-CO connues

Si la formation des CO méiotiques est limitée, une hypothèse est qu'il doit exister des facteurs protéiques responsables de cette limitation. Peu avaient été découverts au moment où j'ai entamé mes travaux de recherche : RTEL-1 et DPY28 chez *C.elegans* et SGS1 chez *S.cerevisiae*. Mais de nombreuses anti-recombinases mitotiques ont été décrites, et pourraient faire d'excellents candidats anti-CO méiotiques.

3.3.1 Des protéines anti-CO méiotiques

RTEL1 a été identifiée chez la souris comme un régulateur de la longueur des télomères (*Regulator of Telomere Length*, DING et al. 2004). RTEL1 est impliquée dans la stabilité du génome chez l'homme, en diminuant la réparation par la HR en dissociant les D-loop (BARBER et al. 2008). L'étude de l'homologue chez *C.elegans* (YOUNDS et al. 2010) a pu

montrer que le mutant *rtel-1* présente une augmentation de 2,5 fois de la distance génétique sur cinq intervalles et que l'interférence n'est plus détectable. RTEL-1 de *C.elegans* possède une activité de dissociation de D-loop *in vitro*, et son activité serait stimulée par la présence de la protéine RPA. Ces données ont permis de former le modèle dans lequel RTEL-1 pourrait avoir un rôle très précoce de dissociation des D-loop méiotiques afin de limiter la formation des crossovers. Il a été montré que les extra-CO de *rtel-1* sont toujours dépendants de la voie canonique de formation des CO chez *C.elegans* : *rtel-1* n'est pas capable de supprimer le défaut de formation de CO du mutant *cosa-1* (YOKOO et al. 2012). Mais, le nombre de foyers ZHP-3 et COSA-1 n'augmente pas en fond *rtel-1* (YOKOO et al. 2012; YOUNDS et al. 2010). Il a donc été proposé que COSA-1/MSH5 puissent protéger les intermédiaires de recombinaison de la dissociation par RTEL-1, et qu'à l'inverse RTEL-1 soit nécessaire au désengagement de COSA-1/MSH5 sur les sites non-désignés pour devenir des CO. L'absence de RTEL-1 pourrait permettre à ces intermédiaires de progresser pour donner des CO, sans pour autant accumuler les protéines pro-CO de façon à pouvoir les détecter (YOKOO et al. 2012). Il est donc probable que les mécanisme de *désignation* des CO et donc l'interférence ne soient pas touchés, mais que *l'implémentation* de cette décision soit perturbée par l'absence de RTEL-1.

Une activité biochimique similaire a été décrite pour la protéine SGS1. SGS1 fait partie d'un groupe fonctionnel de protéines appelé STR chez la levure (pour SGS1-TOP3-RMI1) aussi appelé BTB chez l'Homme (BLOOM-TOP3-BLAP75) ou RTR chez les autres espèces (RECQ4-TOP3-RMI1). La nomenclature n'est pas strictement suivie, et chez *Arabidopsis*, le complexe pourrait s'appeler RTB (RECQ4-TOP3-BLAP75) (CHELYSHEVA et al. 2008). Le rôle de ces protéines a été majoritairement étudié dans un contexte somatique (voir ci-dessous). Il a été montré que SGS1 pouvait dissocier les D-loop *in vitro*, de façon analogue à RTEL1, probablement pour limiter la HR dans les cellules somatiques (BRABANT et al. 2000). En méiose, la mutation *sgs1* mène à une augmentation du nombre de CO, et supprime partiellement les défauts d'un mutant *zmm* (JESSOP et al. 2008; OH et al. 2008), indiquant un rôle anti-CO pour SGS1. En revisitant le rôle de cette protéine, il a été montré que SGS1 serait capable de désassembler des intermédiaires précoces et/ou complexes et de les entrainer vers la voie SDSA pour former des NCO (DE MUYT et al. 2012). Dans un mutant *sgs1*, les intermédiaires complexes seraient pris en charge par les résolvases MUS81, SLX1 et YEN1 pour former des CO (voir aussi 2.3.3).

RTEL1 et SGS1 ont donc des fonctions similaires de dissolution des D-loop et de promotion de la réparation des cassures par des voies alternatives indépendantes des ZMM, en favorisant la formation de NCO. Ces deux protéines sont donc de très bons exemples de protéines anti-CO qui pourraient réguler la balance CO/NCO chez *S.cerevisiae* et *C.elegans*. Une étude chez *Arabidopsis* a pu montrer que les protéines XRCC2 et RAD51B

pourraient être des protéines anti-CO, sans que le mécanisme n'ait été démontré (DA INES et al. 2013). Des mécanismes similaires de régulation de la formation/dissolution de D-loop pourraient être à l'œuvre dans ces mutants.

Chez *C.elegans*, le mutant *dpy28* induit une augmentation du nombre de cassures double-brin et une augmentation du nombre de crossovers (METS et al. 2009). DPY-28 fait partie d'un des complexes condensine impliqués dans la structure des chromosomes et leur condensation en mitose et en méiose (LOSADA 2005). La mutation de ces condensines entraîne une augmentation de la longueur de l'élément central du SC (METS et al. 2009) : les auteurs proposent que la longueur de l'axe pourrait réguler la fréquence et la position des DSB, et ainsi influencer sur la distribution des CO. Une fois encore, ces extra-CO observés dans le mutant *dpy28* ne sont pas marqués par COSA-1 (YOKOO et al. 2012), et il est donc très probable que l'interférence ne soit pas affectée dans ce mutant. Ce système de régulation du nombre de crossovers par le nombre de cassures pourrait être spécifique à *C.elegans*. En effet, le ratio entre le nombre de cassures et le nombre de CO chez *C.elegans* semble très proche de 1 : le nombre de DSB serait de 2.1 pour 1 CO par chromosome (METS et al. 2009; YOUNDS et al. 2010). Ce ratio particulièrement bas semble plutôt être une exception parmi les eucaryotes : l'homme et la souris formeraient quelques centaines de DSB pour quelques dizaines de CO (BAUDAT et al. 2007), tout comme *Arabidopsis* et les autres plantes (CHELYSHEVA et al. 2007; DE MUYT et al. 2009), tandis que la levure formerait 140-170 DSB pour 80-90 CO (BUHLER et al. 2007; MANCERA et al. 2008). Il est donc probable que chez ces espèces, le nombre de cassures ne soit pas limitant pour former des CO, contrairement à chez *C.elegans*.

3.3.2 Quid des protéines anti-CO mitotiques ?

En se basant sur les modèles de voies de recombinaisons (Figure 2.4 et 2.6), il est possible de mettre en évidence des carrefours menant, ou non, à la formation des crossovers méiotiques. Quels sont les mécanismes possibles pour limiter les crossovers, et quelles sont les protéines candidates pour jouer le rôle d'anti-CO ?

Un premier carrefour dans la formation des CO est franchi lors de l'invasion simple brin (SEI). SGS1 et RTEL-1 jouent un rôle à cette étape (ci-dessus). SRS2 est une hélicase capable de dissocier le filament RAD51 et d'empêcher l'invasion (KREJCI et al. 2003; VEAUTE et al. 2003), et les mutants *srs2* présentent une augmentation de la recombinaison somatique (IRA et al. 2003), avec un ratio CO/NCO modifié, qui suggère un rôle de SRS2 dans la formation des NCO en mitose (IRA et al. 2003). Il a donc été proposé que SRS2 pourrait envoyer les intermédiaires de recombinaison vers la voie SDSA (DUPAIGNE et al. 2008; KREJCI et al. 2003). Tout comme SGS1 et SRS2, les autres hélicases sont aussi de

bons candidats anti-CO. La protéine MPH1 de *S.cerevisiae* (FANCM chez les mammifères) a par exemple été montrée comme capable de dissocier les D-loop (PRAKASH et al. 2009), et sa mutation dans les cellules somatiques entraîne une augmentation des NCO formés par SDSA au détriment de la formation de dHj (MITCHEL et al. 2013).

Un deuxième carrefour consiste en la formation et la stabilisation de la double-jonction de Holliday (dHj). En plus de son rôle dans la dissolution des D-loop, FANCM et son homologue chez *S.pombe*, FML1, ont été montrés comme capables de faire migrer les branches des jonctions de Holliday, les impliquant dans une limitation du nombre de CO lors de la réparation des DSB somatiques (GARI et al. 2008 ; SUN et al. 2008). Le complexe BTB a aussi été impliqué dans la dissolution des dHj : l'hélicase BLOOM/RECQ/SGS1 ainsi que TOP3 feraient d'abord converger les deux jonctions, formant un hémicaténa (Figure 2.4). La résolution de cet intermédiaire toxique se fait grâce à TOP3 et RMI1/BLAP75, et mène à la formation d'un NCO (MANKOURI et al. 2007). Cette double fonction de SGS1 (dissociation de D-loop et dissolution des dHj) conduit à l'idée que la prévention des CO est une fonction fondamentale et conservée du complexe BTB.

Un dernier carrefour consiste en la résolution de la dHj : asymétrique pour donner un CO ou symétrique pour donner un NCO. Quelles sont les protéines connues pour leur rôle en mitose qui pourraient jouer sur la résolution des dHj pour limiter la formation des CO ? Chez *S.cerevisiae*, le mutant *sgs1* ne forme presque plus de CO dépendant des ZMM, et les nucléases MUS81-MMS4, SLX1-SLX4 et YEN1 sont alors essentielles à la résolution des intermédiaires de recombinaison (DE MUYT et al. 2012). Dans *sgs1*, les CO et les NCO sont diminués, indiquant que ces trois nucléases résolvent les dHj de manière non biaisée et forment à la fois des CO et des NCO (DE MUYT et al. 2012), contrairement au sauvage où la très grande majorité des dHj sont résolues comme CO (ALLERS et al. 2001 ; BÖRNER et al. 2004). Tout ceci indique qu'il est théoriquement possible d'influer sur la résolution des double-jonctions de Holliday pour favoriser, ou non, la formation des crossovers.

Dans ces trois derniers chapitres, je me suis attachée à résumer l'état des connaissances sur la régulation de la formation des CO méiotiques. L'état de l'art montre que nos connaissances en la matière restent parcellaires. Il est donc intéressant de développer de nouvelles approches capables de nous donner un nouvel éclairage sur ces questions. Notamment, la mise en place de cribles de génétique directe sans *a priori* peuvent permettre de mettre en évidence de nouveaux acteurs dans ces voies de régulation. De tels cribles ont été mis en place au sein de l'Equipe Méiose et Recombinaison de l'INRA de Versailles, et nous avons pu mettre en évidence deux nouvelles voies de régulation des CO : une dépendant de la protéine FANCM et de ces deux co-facteurs MHF1-MHF2, ainsi qu'une voie dépendant de la protéine FIGL1. Je vais donc introduire la voie Fanconi anemia (page 69) donc FANCM est un partenaire important, ainsi que la famille des AAA-ATPase dont FIGL1 fait partie (page 77).

La voie Fanconi de réparation de l'ADN

La surveillance de l'intégrité du génome au cours de la vie et de la division cellulaire est assurée par un grand nombre de voies et de protéines différentes (ATM/ATR, RAD51, complexe MRX, protéines Bloom, ...). La voie Fanconi Anemia (FA), du nom de la maladie humaine, l'anémie de Fanconi, est une voie de signalisation des lésions de l'ADN qui coopère avec les autres voies pour la résolution de ces lésions.

4.1 L'anémie de Fanconi, une maladie humaine

Dans les années 1920, le pédiatre Guido Fanconi (1892-1979) s'intéresse à des enfants des vallées alpines (où le taux de consanguinité est à l'époque supérieur aux autres territoires français et italiens) atteints de malformations congénitales avec apparition d'aplasie médullaire (insuffisance de production de moelle osseuse) et des risques aigus de leucémie et de cancer. L'anémie de Fanconi est une maladie héréditaire récessive bien caractérisée aujourd'hui. L'espérance de vie des patients est d'une vingtaine d'années. Il existe en France une association de défense et d'accompagnement des malades atteints de cette maladie, l'AFMF. Sa prévalence est d'une naissance sur 350 000 et concerne tous les groupes ethniques.

Il existe une très grande hétérogénéité phénotypique chez les malades atteints de l'anémie de Fanconi et le tableau clinique est très variable d'un patient à un autre, même au sein d'une même famille (portant la même mutation). Les études sur les patients ont néanmoins permis de révéler un phénotype cellulaire spécifique à l'anémie de Fanconi : leurs lymphocytes mis en culture montrent une hypersensibilité aux agents réticulants (*cross-linking agent*) de type MMC (mitomycin C) qui induisent des liaisons entre les deux brins complémentaires de l'ADN (*interstrand crosslink* ou ICL) (JOENJE et al. 2001). Ces liaisons covalentes empêchent les deux brins de l'ADN de se dé-hybrider et bloquent les fourches de réplication ainsi que la transcription. La voie FA est une des voies de réparation de ces ICL, en permettant le recrutement de la machinerie de recombinaison

homologue et la machinerie de réplication trans-lésionnelle (KEE et al. 2010).

Les premières expériences de complémentations cellulaires ont mis en évidence 17 gènes différents responsables de la maladie (JOENJE et al. 1997) et ont été nommés avec le préfixe *FANC* (Table 4.1). Des cofacteurs de ces protéines ont aussi été mis en évidence : MHF1, MHF2, les protéines FAAP (*FA-associated protein*). Bien qu'aucun patient atteint de FA ne porte de mutation détectée dans les protéines MHF1, MHF2 ou FAAP, les protéines interagissent directement avec les protéines FANC et leur mutation induit le phénotype cellulaire canonique de la FA (LING et al. 2007 ; SINGH et al. 2010 ; YAN et al. 2010).

4.2 Rôle somatique des protéines Fanconi

Les 17 gènes FA ainsi que leurs cofacteurs sont classiquement classés en trois sous-groupes (Table 4.1) : le complexe principal, le complexe FA-ID et les partenaires en aval. Le fonctionnement global de la voie semble être le suivant : le complexe principal est recruté aux lésions de l'ADN puis recrute le complexe FA-ID et procède à son ubiquitination, ce qui permet ensuite de recruter les protéines des autres voies de réparation de l'ADN (Figure 4.1). L'ubiquitination de FANCD2 (complexe FA-ID) semble être le carrefour de la voie FA et est primordiale pour le recrutement des partenaires en aval. Certains partenaires de la voie FA sont conservés chez *C.elegans* et *D.melanogaster* (CASTILLO et al. 2003 ; COLLIS et al. 2006 ; LEE et al. 2010 ; MAREK et al. 2006) et semblent aussi être impliqués dans la voie de réparation des ICL indiquant que cette voie est conservée au moins chez les métazoaires (voir Résultats).

4.2.1 Les protéines du complexe principal

Le complexe principal a une activité E3 ubiquitine ligase portée par FANCL (MEETEI et al. 2004) dont le substrat est le complexe FA-ID (voir 4.2.2). FANCM est une des protéines qui interagit directement avec l'ADN et qui est capable de débobiner les fourches de réplication et les jonctions de Holliday grâce à son activité hélicase, et qui sert aussi de plateforme d'assemblage au complexe principal (voir 4.2.1.1).

FANCG est une protéine de structure qui forme deux sous complexes. Le premier est composé de FANCA, FANCC et l'endonucléase ERCC1 et serait notamment impliqué dans la résolution des ICL avant réparation (WANG et al. 2010a). FANCG serait impliqué dans un deuxième sous-complexe avec FANCD2 (complexe FA-ID) et XRCC3 impliqué dans la recombinaison homologue (WILSON et al. 2008). FANCE est important pour le recrutement du complexe FA-ID après liaison du complexe FA sur les lésions de l'ADN (POLITO et al. 2014). Les autres protéines (FANCA, B, C et F) n'ont pas de fonction

TABLE 4.1 – Liste des protéines impliquées dans la voie Fanconi Anemia et leur fonction associée, quand elle est connue

Protéine	Fonction	Références
Complexe principal		
FANCA	Participe à la stabilité du complexe principal avec FAAP20	ALI et al. 2012 ; LEUNG et al. 2012
FANCB		
FANCC		
FANCE	Recrute FANCI et FANCD2 pour procéder à leur mono-ubiquitination	POLITO et al. 2014
FANCF		
FANCG/ XRCC9	Protéine de structure, possède un motif TPR médiateur d'interactions protéine-protéine	WILSON et al. 2008
FANCL	Ubiquitine E3 ligase	MEETEI et al. 2004
FANCM/ FAAP250	Hélicase, sert de plateforme de recrutement au core complexe	KIM et al. 2008
MHF1\CENP-S/ FAAP16	Cofacteur direct de FANCM qui potentialise son activité hélicase	SINGH et al. 2010 ; YAN et al. 2010
MHF2/ CENP-X/ FAAP10	Cofacteur direct de FANCM qui potentialise son activité hélicase	SINGH et al. 2010 ; YAN et al. 2010
FA-ID et FAN1		
FANCI	Empêche l'appariation de CDB spontanées, grande affinité pour les jonction de Holliday. Interagit avec FAN1	SMOGORZEWSKA et al. 2007
FANCD2	Lie les extrémités d'ADN double brin et les les jonctions de Holliday. Son ubiquitination est essentielle à la réparation des ICL.	GARCIA-HIGUERA et al. 2001 ; SEKI et al. 2007
FAN1	Exonucléase et endonucléase, interagit avec MLH1 et MLH3	SMOGORZEWSKA et al. 2010
Les partenaires en aval		
FANCD1/ BRCA2	Régule les recombinaisons RAD51 et DMC1 en mitose et en méiose	SCULLY et al. 1997
FANCI/ BRIP1 BACH1	Hélicase avec un domaine de liaison à BRCA1, lie préférentiellement les substrat d'ADN branchés	GUO et al. 2014
FANCN/ PALB2	Forme des oligomères aux sites de lésion de l'ADN, recrute BRCA2 et régule son interaction à BRCA1	XIA et al. 2006
FANCO/ RAD51C	Nécessaire à la formation des foyers RAD51 suite à des cassures double brin	VAZ et al. 2010
FANCP/ SLX4/ BTBD12	Endonucléase, résolvasse de jonctions de Holliday	FEKAIRI et al. 2009 ; SVENDSEN et al. 2009
FANCO/ ERCC4/ RAD1	Endonucléase, affinité pour les jonctions de Holliday	CICCIA et al. 2008

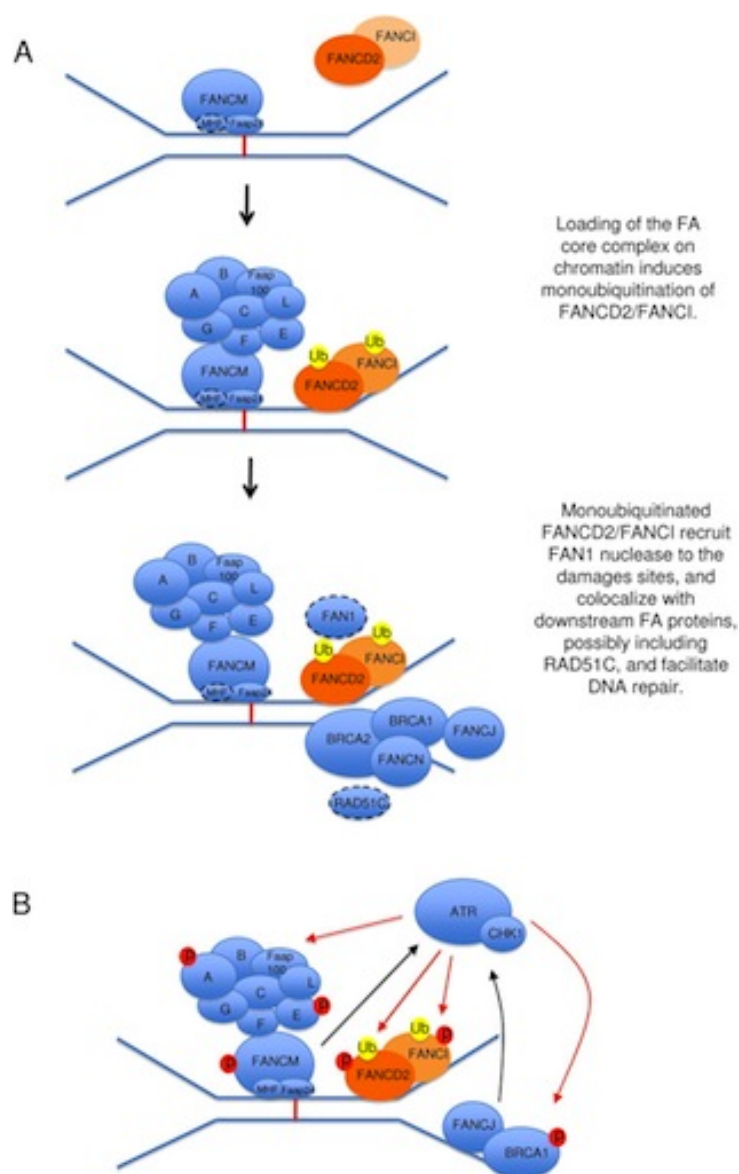


FIGURE 4.1 – **Modèle schématique du fonctionnement de la voie FA**, issu de KEE et al. 2010. A) L'activation de la voie FA commence par le recrutement de FANCM à la lésion, grâce ses cofacteurs MHF1, MHF2 et FAAP24. Ce complexe recrute ensuite le complexe principal, qui peut procéder à l'ubiquitination du complexe FA-ID. FANCD2 ubiquitiné peut alors recruter FAN1 et d'autres protéines du groupe des partenaires en aval, afin de procéder à la réparation de la lésion. B) La voie FA est en dialogue constant avec les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire (ATR-CHK1), la phosphorylation du complexe principal par ATR étant essentielle au fonctionnement de la voie.

spécifique connue, mais participent à l'assemblage du complexe, et sont toutes nécessaires à l'ubiquitination de FANCD2 (GARCIA-HIGUERA et al. 2001 ; KIM et al. 2011 ; NIEDZWIEDZ et al. 2004). La plupart des protéines de ce complexe sont des substrats directs d'ATR et des kinases CHK1 et PLK1, et la phosphorylation est essentielle au fonctionnement de la voie (KEE et al. 2010). Cette interaction entre la voie FA et les protéines de points de contrôle du cycle cellulaire est essentielle à l'arrêt du cycle de réplication pour procéder à la réparation des lésions de l'ADN (Figure 4.1).

4.2.1.1 FANCM

FANCM, avec ses homologues chez les levures MPH1 et FML1, est une hélicase/translocase et à ce titre possède les sept motifs conservés chez les hélicases, y compris le domaine Walker A et un domaine Walker B modifié appelé boîte DEAH (ces deux derniers domaines sont importants pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP nécessaires à sa fonction). Chez certaines espèces, FANCM a conservé un domaine nucléase ERCC4 (MEETEI et al. 2005), mais même lorsqu'il est présent, ce domaine a apparemment perdu la possibilité de cliver l'ADN par mutation (chez l'Homme, CICCIA et al. 2007 ; WHITBY 2010). Ses substrats, *in vitro*, sont principalement des intermédiaires ADN à 3 ou 4 branches (fourche de réplication, D-loop, jonction de Holliday) et son activité hélicase lui permet de faire migrer les branches des jonctions de Holliday et de dissocier les D-loop (détaillé dans WHITBY 2010).

La fonction de FANCM au sein de la voie FA est primordiale : l'inactivation de la protéine induit une réduction de l'ubiquitination de FANCD2 (SINGH et al. 2009) et le complexe principal n'est plus capable de se lier à la chromatine (KIM et al. 2008). FANCM est capable de se lier à la chromatine grâce à ses cofacteurs (voir 4.2.1.2) et interagit avec HCLK2, un interactant d'ATR (COLLIS et al. 2008). FANCM pourrait donc agir comme un senseur des fourches de réplifications bloquées, puis recruter à la fois ATR et le complexe FA. De façon paradoxale, la mutation de *FANCM* est capable d'atténuer les effets des mutations dans *FANCA* (KIM et al. 2008). Ces résultats impliquent que, une fois que FANCM est recruté, la réparation est engagée dans la voie FA, et que la mutation *FANCM* permet de lever cet engagement et de faire appel à d'autres mécanismes de réparation.

Au-delà de son rôle dans la voie FA, FANCM présente un rôle anti-crossover dans les cellules somatiques : les cellules mutées pour *FANCM* présentent une augmentation des échanges entre chromatides sœurs (*sister chromatid exchange*, SCE) et de la formation de CO entre chromosomes homologues (PRAKASH et al. 2009 ; ROSADO et al. 2009). Il a été montré que FANCM pouvait notamment dissoudre les D-loops pour empêcher la formation des doubles jonctions de Holliday, et ainsi renvoyer les intermédiaires de recombinaison

vers la voie SDSA (PRAKASH et al. 2009).

4.2.1.2 FAPP24, MHF1 et MHF2, des cofacteurs de FANCM

En dehors des protéines *FANCD2*, de nouveaux composants du complexe principal ont été découverts lors de l'immunoprécipitation des partenaires de FANCM. Le premier fut FAAP24 (*FA associated protein of 24kDa*) (CICCIA et al. 2007). La précipitation réciproque, en prenant FAAP24 comme appât, montre que FAAP24 s'associe avec le complexe principal de la voie FA (FANCA, FANCB, FANCG et FANCL). La déplétion de FAAP24 induit une diminution du nombre de foyers FANCD2 et des instabilités chromosomiques dans les cellules traitées à la MMC. Des expériences de retard sur gel montrent que FAAP24 a une préférence pour l'ADN simple brin. FANCM seul ne lie que peu fortement l'ADN, mais en complexe avec FAAP24, son affinité pour l'ADN simple brin est fortement augmentée.

De la même façon, en prenant FANCM comme protéine appât, la filtration sur gel suivie par de la spectrométrie de masse a permis l'identification de MHF1 et MHF2 (SINGH et al. 2010 ; YAN et al. 2010). MHF1 et MHF2 sont deux petites protéines (16kDa et 10kDa respectivement) qui s'associent en hétéro-oligomère indépendamment du complexe FA (WANG et al. 2013 ; YAN et al. 2010). MHF1 interagit directement avec FANCM (SINGH et al. 2010) et permet l'assemblage d'un sous-complexe comportant les trois protéines FANCM-MHF1-MHF2. Les MHFs ont une grande affinité pour l'ADN double brin et pour les structures branchées (ZHAO et al. 2013) et les MHF seraient indispensables au chargement de FANCM sur les fourches de réplifications bloquées (YAN et al. 2010). MHF1-MHF2 et FANCM interviennent dans la même voie, à la fois pour l'induction de la voie FA (ubiquitination de FANCD2) et pour la limitation des SCEs (YAN et al. 2010).

4.2.2 Le complexe FA-ID, FAN1 et les partenaires en aval

Le complexe FA-ID est composé des deux protéines FANCD2 et FANCI. Ces deux protéines semblent être des activateurs réciproques l'une de l'autre, la déplétion de l'une entraînant une diminution de l'ubiquitination de l'autre (SMOGORZEWSKA et al. 2007). Les deux protéines sont ubiquitinées par le complexe principal (MEETEI et al. 2003). Le rôle de ces protéines et de leur ubiquitination n'est pas encore clair. Il a été proposé que FAN1 pourrait interagir avec FANCD2 ubiquitiné pour résoudre les ICL (KRATZ et al. 2010 ; LIU et al. 2010 ; MACKAY et al. 2010 ; SMOGORZEWSKA et al. 2010) en incisant le brin d'ADN pour procéder à l'excision des paires de bases liées de façon covalente (voir notamment le schéma interprétatif de Smogorzewska et collègues). Il a aussi été montré que FANCD2 pouvait interagir avec des protéines de la voie de recombinaison homologue

BRCA1, BRCA2, RAD51 (KEE et al. 2010). De plus, les partenaires en aval de FANCD2 et FANCI sont des protéines de la machinerie de recombinaison homologue : BRAC2 est aussi appelé FANCD1 ; PALB2, qui régule BRCA2, a été renommé FANCN ; RAD51C est FANCO.

4.3 Indications pour de nombreux sous-complexes indépendants de la voie FA

Les expériences d'immunoprécipitation des différentes protéines ont permis de montrer que les différents partenaires de la voie pouvaient être impliqués dans plusieurs sous-complexes plus ou moins indépendants de la voie FA *per se*. Notamment, FAAP100 peut être purifié en interaction avec FANCB et FANCL indépendamment du complexe principal, mais FAAP100 est aussi impliqué dans la voie FA puisque sa mutation entraîne une diminution de l'ubiquitination de FANCD2 (LING et al. 2007). Des observations similaires peuvent être faites pour FANCA avec FAAP20 (LEUNG et al. 2012), avec BRCA1 (GARCIA-HIGUERA et al. 2001), et avec FANCL (MEDHURST et al. 2006) ; FANCM avec MHF1-MHF2 (SINGH et al. 2010 ; YAN et al. 2010) et avec FAAP24 (CICCIA et al. 2007) ; FANCG avec ERCC1, FANCF et FANCA (WANG et al. 2010a) ainsi qu'avec FANCD1, FANCD2 et XRCC3 (WILSON et al. 2008). Ces observations *in vitro* n'ont pour la majorité pas été confirmées *in vivo*, mais il peut être intéressant de considérer que ces protéines peuvent avoir accumulé des fonctions différentes au cours de l'évolution, et que ces sous-complexes soient le reflet de nouveaux rôles biologiquement importants pour la vie de la cellule et de l'organisme indépendamment de la voie FA.

4.4 Implication des protéines Fanconi en méiose

Les liens entre voie FA et méiose sont ténus. Le rapprochement est pourtant attrayant : comme décrit en 2.1, la recombinaison est initiée par la formation de cassures double brins, qui doivent être réparées au cours de la prophase I. Il serait donc intéressant de savoir si les protéines FA sont impliquées dans la recombinaison homologue méiotique ou dans la réparation des DSB indépendamment de la HR. Les patients atteints de FA présentent souvent des problèmes de fertilité, et les souris mutées pour les gènes FANCA, FANCC et FANCG sont stériles (CHENG et al. 2000 ; KOOMEN et al. 2002 ; WHITNEY et al. 1996). Aujourd'hui, on ne sait si cette stérilité provient de défauts de réparation pré-méiotique plutôt que de défauts de méiose.

Le rôle de FANCD2 en méiose a été plus étudié, notamment chez *C.elegans* (ADAMO

et al. 2010). Chez cette espèce, FANCD2 semble superfétatoire pour la formation des crossovers, mais le mutant accumule les foyers RAD51 en prophase, ce qui semblerait indiquer un problème de réparation des DSBs et qui rappelle le phénotype du mutant *brca1*. En combinaison avec les mutations dans SYP-2 (élément central du complexe synaptonémal), le mutant *fancd2* présente des appariements non-homologues (révélés par FISH en diacynèse) qui sont supprimés par la mutation supplémentaire de LIG-4, une protéine impliquée dans le NHEJ. Ces données suggèrent que FANCD2 limite les engagements non-homologues d'intermédiaires de recombinaison et que ces événements non-homologues sont créés par NHEJ. FANCD2 aurait donc un rôle de limitation du NHEJ en méiose chez *C.elegans*. Chez la souris, FANCD2 et BRCA1 sont localisés sur les parties non synapsées de l'axe des chromosomes sexuels dans les spermatocytes au stade zygotène (GARCIA-HIGUERA et al. 2001). Il est donc possible que FANCD2 régule le déroulement de la méiose et de la recombinaison des chromosomes sexuels chez la souris.

Les AAA-ATPases

L'énergie nécessaire aux réactions chimiques cellulaires est biochimiquement stockée sous forme d'ATP (adénosine tri-phosphate) chez tous les êtres vivants (SCHOPF 2002). La réaction d'hydrolyse de l'ATP en ADP (adénosine di-phosphate) est une réaction exergonique et produit une énergie équivalente à 25kJ par mole (2mg d'ATP, qui correspond à peu près à la combustion d'un gramme d'essence). Cette énergie est mobilisable par un grand nombre d'enzymes, dont les ATPases, qui peuvent convertir cette énergie en force (chimique, motrice, de torsion).

Les ATPases sont présentes dans tous les règnes du vivant (FRICKEY et al. 2004) et ont été classées en diverses familles phylogénétiques et fonctionnelles. La famille de AAA-ATPase est une des plus grandes et comprend des protéines impliquées dans des fonctions cellulaires particulièrement diversifiées, d'où leur nom : ATPases Associated with various cellular Activity (ATPases associées à diverses fonctions cellulaires). Malgré leur grande diversité de structures et de fonctions, ces AAA-ATPases sont toutes des mécano-enzymes qui chaperonnent d'autres protéines : elles sont impliquées dans le repliement de protéines, la modulation d'interactions protéine-protéine, la dégradation par le protéasome ou le désassemblage de macromolécules (VALE 2000). Parmi les AAA-ATPases, je m'attacherai plus particulièrement à la protéine FIGDETIN-LIKE-1 (FIGL1) qui a été identifiée dans nos cribles génétiques (Résultats).

5.1 Qu'est-ce qu'une AAA-ATPase ?

La première AAA-ATPase décrite fut PAS1, une protéine nécessaire à l'assemblage des peroxysomes chez *Saccharomyces cerevisiae* (ERDMANN et al. 1991). Les auteurs suggèrent alors que PAS1, qui possède des domaines très conservés, fait partie d'une nouvelle famille d'ATPases issues d'un même ancêtre commun. Les protéines de ce groupe monophylétique ayant des fonctions décrites très diverses (contrôle de la division cellulaire, régulation de l'expression génique chez le virus de l'immunodéficience humaine - VIH), la notion de AAA-ATPase est née.

5.1.1 Structure protéique des AAA-ATPases

Les AAA-ATPases sont une sous-famille des P-loop NTPases, qui partagent toutes une structure quaternaire commune constituée d'une succession d'hélices α et de feuillets β (cœur $\alpha\beta\alpha$) ainsi que d'un motif Walker A ($GX_4GK[S/T]$) et Walker B (constitué de 4 acides aminés hydrophobes suivis de $[D/E]$) (WALKER et al. 1982). Ces deux domaines sont importants pour l'interaction et la liaison aux NTP (ATP ou GTP typiquement). La famille des AAA+ ATPases contient les AAA canoniques, ainsi que des protéines telles que la RuBisCO Activase, les protéines Clp et des hélicases virales (SNIDER et al. 2008).



FIGURE 5.1 – Les AAA-ATPases présentent des motifs conservés spécifiques. Alignement du module AAA+ de quatre AAA-ATPases canoniques par T-COFFEE. Les deux domaines Walker A et B (en rouge) ainsi que le domaine SRH (en vert) sont indiqués. Les résidus importants sont aussi mentionnés : le doigt arginine (en rose), les domaines senseurs 1 et 2 (en bleu). Les acides aminés conservés sont indiqués en pourcentage d'identité (100% orange; 75% jaune). Hs_VCP_P97 : *Homo sapiens* Valosin Containing Protein, Mm_NSF : *Mus musculus* N-ethylmaleimide-sensitive factor, Ec_FtsH : *Escherichia coli* ATP-dependent metalloprotease, Ce_Mei-1 : *Cenorhabditis elegans* microtubule severing enzyme. Figure réalisée sur Jalview d'après OGURA et al. 2004.

Le module AAA+, qui identifie les AAA-ATPase des autres ATPases, est constitué

des deux domaines Walker A et B ainsi que d'un domaine dit SRH (*Second Region of Homology*), de deux domaines senseurs de l'ATP (senseur 1 et 2) et d'un "doigt d'arginine" (*arginin finger*), tous concentrés dans une région de 200 à 250 acides aminés (Figure 5.1). Le domaine SRH n'a pas de fonction associée connue mais est un marqueur monophylétique fort (LUPAS et al. 2002). Il comprend le domaine senseur 1, qui contient un résidu polaire (Thréonine, Sérine ou Histine) qui pourrait interagir avec l'ATP ou bien avec la molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse (KARATA et al. 1999). Le domaine senseur 2 situé en aval contient un résidu arginine (R) qui interagit directement avec le groupement phosphate de l'ATP. Le "doigt arginine" est impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP (JOHNSON 2003; KARATA et al. 1999).

5.1.2 Relation structure fonction des AAA-ATPases

La résolution des structures tridimensionnelles par cristallographie a mis en évidence chez toutes les AAA-ATPases une structure similaire en hexamère formant un anneau (LUPAS et al. 2002) (Figure 5.2A), dont le substrat est souvent lié à plusieurs sous-unités (FARR et al. 2000). Un des modèles d'action pour ces ATPases est qu'un changement de conformation serait transmis au substrat qui serait alors pris comme dans un chevalet d'écartèlement et désassemblé (VALE 2000), Figure 5.2C). Le lien entre changement de conformation et hydrolyse de l'ATP n'est pas complètement élucidé. Il est probable que l'hydrolyse et le relargage du groupement phosphate soit utilisé pour à la fois disloquer le substrat et le dissocier de son site de liaison. A l'inverse, il est aussi possible que la simple liaison à l'ATP permette le changement de conformation, et que l'hydrolyse n'intervienne que pour le relargage du substrat (VALE 2000).

5.1.3 Des substrats très variés

La diversité des rôles biologiques des AAA-ATPases ne résident donc pas dans leur structure commune, mais dans la possibilité d'adapter cette structure à différentes fonctions. Si la partie C-terminale (contenant le module AAA) est conservée, la partie N-terminale est elle très variable et présente des domaines spécifiques à chaque sous famille d'enzymes. Ces domaines peuvent par exemple définir ou moduler une spécificité de substrat. C'est le cas notamment du domaine d'interaction avec les microtubules des protéines Katanin (STOPPIN-MELLET et al. 2007). Malheureusement, ces domaines sont rarement bien définis ou conservés en séquence primaire.

Une autre modulation d'activité a été mise en évidence notamment pour les protéines Clp procaryotes. Des molécules dites adaptatrices, pouvant se lier sur un domaine

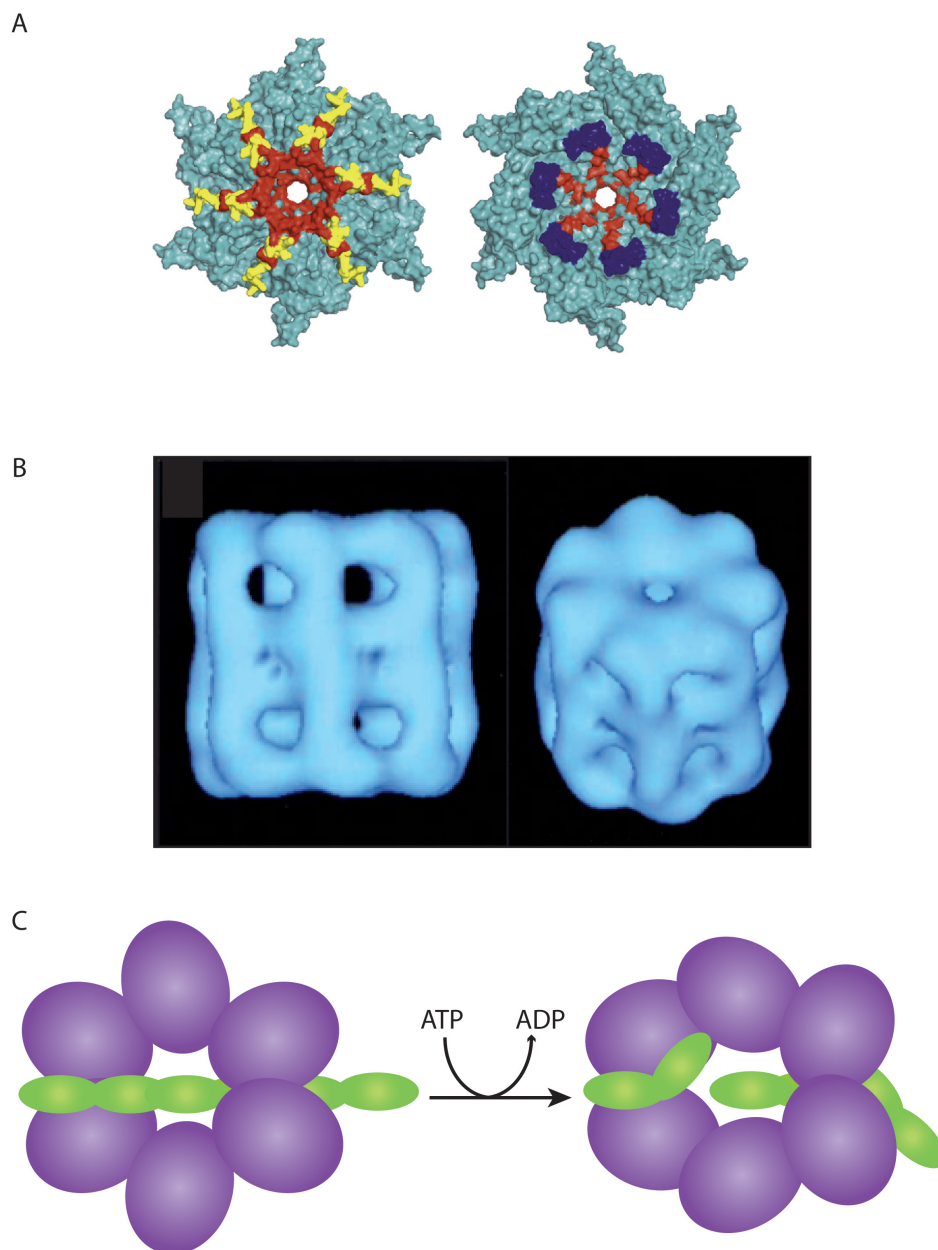


FIGURE 5.2 – Les AAA-ATPases adoptent une conformation hexamérique. A) Vue de haut de la protéine Spastin de drosophile. Les queues C- et N- terminales sont représentées en bleu et jaune respectivement. Les acides aminés du pore importants pour la fonction de la protéine (sectionnement des microtubules) sont indiqués en rouge (ROLL-MECAK et al. 2008). B) Certaines AAA-ATPases s'associent pour former un tonneau, ici la protéine chaperonne GroEl (qui permet notamment le repliement de la RuBisCO, FARR et al. 2000 ; SHTILERMAN 1999). C) Modèle d'action déduit par Ronald Vale (VALE 2000). L'hydrolyse de l'ATP permet un changement de conformation de l'ATPase (en violet) qui est transmis à son substrat (vert). Ce substrat étant lié à plusieurs sous-unités, il est alors soumis à une contrainte mécanique et disloqué.

N-terminal, régulent les Clp et changer leur conformation, moduler leur cinétique enzymatique, ou servir d'adaptateur à leur substrat (MOGK et al. 2004). Si la notion d'adaptateur a été peu étendue, il peut être intéressant de faire le rapprochement avec le cas des protéines Katanin et Vps4. Dans le cas des Katanin, deux sous-unités sont nécessaires à leur fonctionnement : la sous-unité catalytique p60 qui est une AAA-ATPase hexamérique (HARTMAN et al. 1999) et la sous-unité p80 qui est importante pour la localisation de p60 au centrosome des cellules en division et régule négativement son activité (MCNALLY et al. 2000). Dans le cas de Vps4, de nombreuses régulations, positives et négatives, ont été décrites. Tout d'abord, les protéines Vps2 et Vps60 stimulent son activité enzymatique via son domaine MIT et une tierce protéine Vta1 respectivement (AZMI et al. 2008). De plus, il a été montré que la protéine Vps4 recombinante est essentiellement inactive, mais que son activité d'hydrolyse de l'ATP est stimulée par la présence d'ESCRT-III, qui est aussi son substrat (MERRILL et al. 2010).

Tous ces mécanismes de régulation montrent que l'étude de l'ATPase seule ne permet pas toujours de comprendre son rôle biologique et que l'identification des partenaires peut être cruciale.

5.2 Phylogénie des AAA-ATPases

Les relations phylogénétiques entre les différentes familles d'AAA-ATPases ont été sujettes à de nombreuses études, parfois contradictoires (AMMELBURG et al. 2006 ; IYER et al. 2004).

La classification des AAA+ relativement aux AAA canoniques a fait débat. Il est aujourd'hui admis que le domaine SRH est le motif commun nécessaire et suffisant pour reconnaître une AAA-ATPase (LUPAS et al. 2002), excluant notamment les RuvB et les Clp. Au sein des AAA, six principaux clades ont été identifiés (FRICKEY et al. 2004, Figure 5.3) :

- **les metalloprotéases**, dont FtsH, impliquée dans le recyclage des membranes chez les bactéries ;
- **le groupe BSC1**, protéines chaperonnes mitochondriales présentent dans tous les règnes eucaryotes ; ce clade comporte notamment la protéine Pch2 impliquée en méiose (voir partie 5.2.2) ;
- **les sous-unités 26S du protéasome**, qui préparent les substrats à leur dégradation en altérant leur repliement ;
- **les protéines à domaines D1**, dont NSF (Figure 5.1)
- **les protéines à domaine D2**, similaires aux D1 ; ces deux derniers clades possèdent

deux modules AAA ;

- le groupe dit "méiotique" contenant les protéines Fidgetin, Katanin, Spastin, Vps4 et Msp1.

5.2.1 Le clade des AAA-ATPases dites "méiotiques"

L'appellation "méiotique" date de la première étude phylogénétique des AAA-ATPases réalisée par BEYER 1997 car ce clade inclut la protéine MEI-1 de *C.elegans* impliquée dans la formation du fuseau de division dans l'oocyte. Il regroupe en réalité des protéines aux rôles aussi divers que Vps4 (transport de vésicule, FINKEN-EIGEN et al. 1997), Msp1 (maintenance de l'ADN mitochondrial, PELLOQUIN et al. 1999) ou encore Katanin (désassemblage des microtubules, McNALLY et al. 1993).

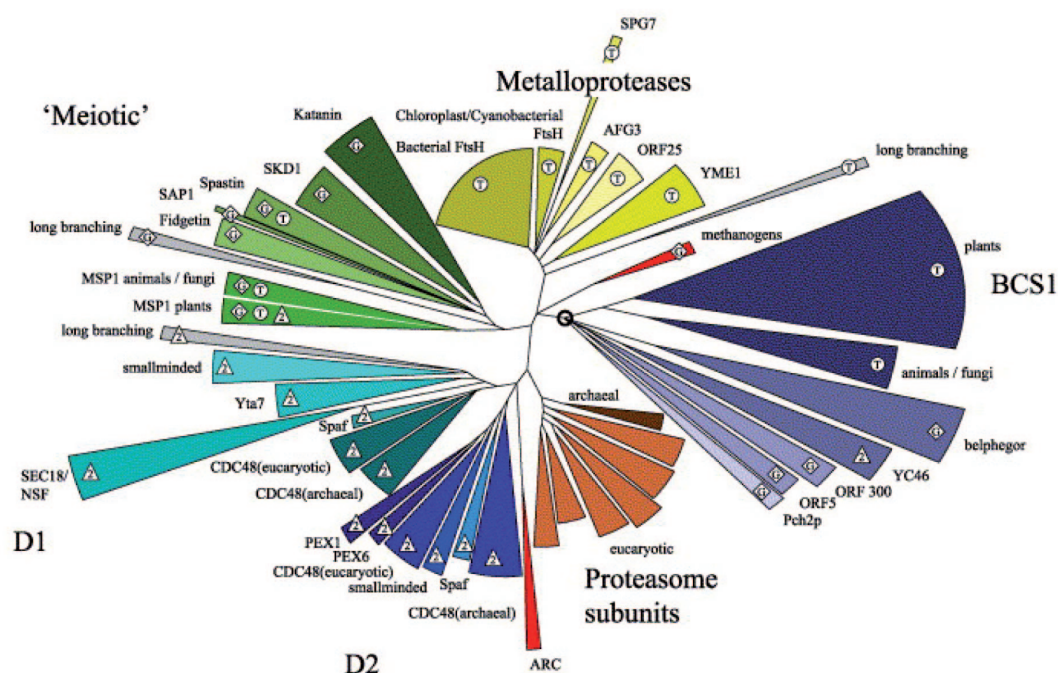


FIGURE 5.3 – Phylogénie des AAA-ATPase d'après FRICKEY et al. 2004. La longueur de chaque branche reflète la longueur de la plus grande branche du clade ; la largeur est proportionnelle au nombre de protéines dans chaque clade.

5.2.1.1 Les protéines de désassemblage des microtubules

Parmi les AAA-ATPases du groupe "méiotique", les protéines de sectionnement par désassemblage des microtubules ont été les plus étudiées. Trois protéines sont comprises dans cette famille : Katanin, Spastin et Fidgetin (Figure 5.4). La première fut Katanin,

découverte chez le Xenope et l'oursin de mer (*Strongylocentrotus purpuratus*) en 1993 par Francis McNally et Ronald Vale (MCNALLY et al. 1993). Leurs travaux sont fondateurs à plusieurs points de vue. Non seulement McNally et Ronald identifient la première enzyme de désassemblage des microtubules, qu'ils nomment Katanin d'après le mot japonais *katana* (sabre), mais ils en énoncent toutes les propriétés fondamentales qui seront ensuite vérifiées chez toutes les autres espèces, à savoir : (1) Katanin est composée de deux sous-unités (p81 et p60) qui interagissent avec un ratio stoechiométrique 1 :1 ; (2) elle catalyse le désassemblage des microtubules en monomères de tubuline ; (3) cette activité est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP ; et est (4) stimulée par la présence de microtubules. L'étude de mutants de Katanine chez *C.elegans* a montré que les mutants *mei-1* présentent des défauts de fuseau de division en méiose (CLARK-MAGUIRE et al. 1994) et que, en méiose, l'activité de katanin est essentielle à l'extrusion du premier globule polaire chez cette espèce (MCNALLY et al. 2006 ; YANG et al. 2003). Chez les plantes, les mutants katanin (*lue1*, *fra2* et *botero*) présentent des défauts de croissance liés à une mauvaise orientation des microtubules dans les cellules somatiques (BICHET et al. 2001 ; BOUQUIN 2003 ; BURK et al. 2001), due à une absence de détachement des microtubules après nucléation (ZHANG et al. 2013). Aucun phénotype méiotique n'a à ce jour été mis en évidence chez les plantes (Yann Duroc et Aurélie Hurel, personal communication).

La protéine Spastin a surtout été étudiée dans un cadre clinique car sa mutation entraîne une paraplégie neuro-dégénérative (*spastic paraplegia*, HAZAN et al. 1999). Spastin a été impliquée dans le développement des neurones chez la drosophile et le poisson zèbre, en relation avec sa fonction de désassemblage des microtubules (SHERWOOD et al. 2004 ; TROTTA et al. 2004 ; WOOD 2006).

5.2.1.2 Fidgetin, une protéine aux multiples fonctions

La sous-famille des protéines Fidgetin comprend trois membres : Fidgetin (FIDG), Fidgetin-like-1 (FIGL1) et Fidgetin-like-2 (FIGL2). Ces trois membres sont conservés chez les mammifères (YANG et al. 2005) et certains autre vertébrés, mais la majorité des eucaryotes ne semble posséder que FIGL1 (COX et al. 2000 ; ZHANG et al. 2007, Figure 5.4). Peu de données fonctionnelles sont disponibles sur ces trois protéines.

Fidgetin tient son nom d'un mutant de souris présentant des défauts pléiotropes (problèmes de développement neuronaux, de morphogenèse du palais, ...) associés à des défauts de comportement : les mutants remuent dans tous les sens et dodelinent de la tête. Le mot *fidget* en anglais signifiant remuer, gigoter, le gène fut baptisé Fidgetin (COX et al. 2000 ; GRÜNEBERG 1943). Plus récemment, la protéine FIDG humaine a été démontrée comme désassemblant les microtubules *in vitro* (MUKHERJEE et al. 2012) (Figure 5.5F),

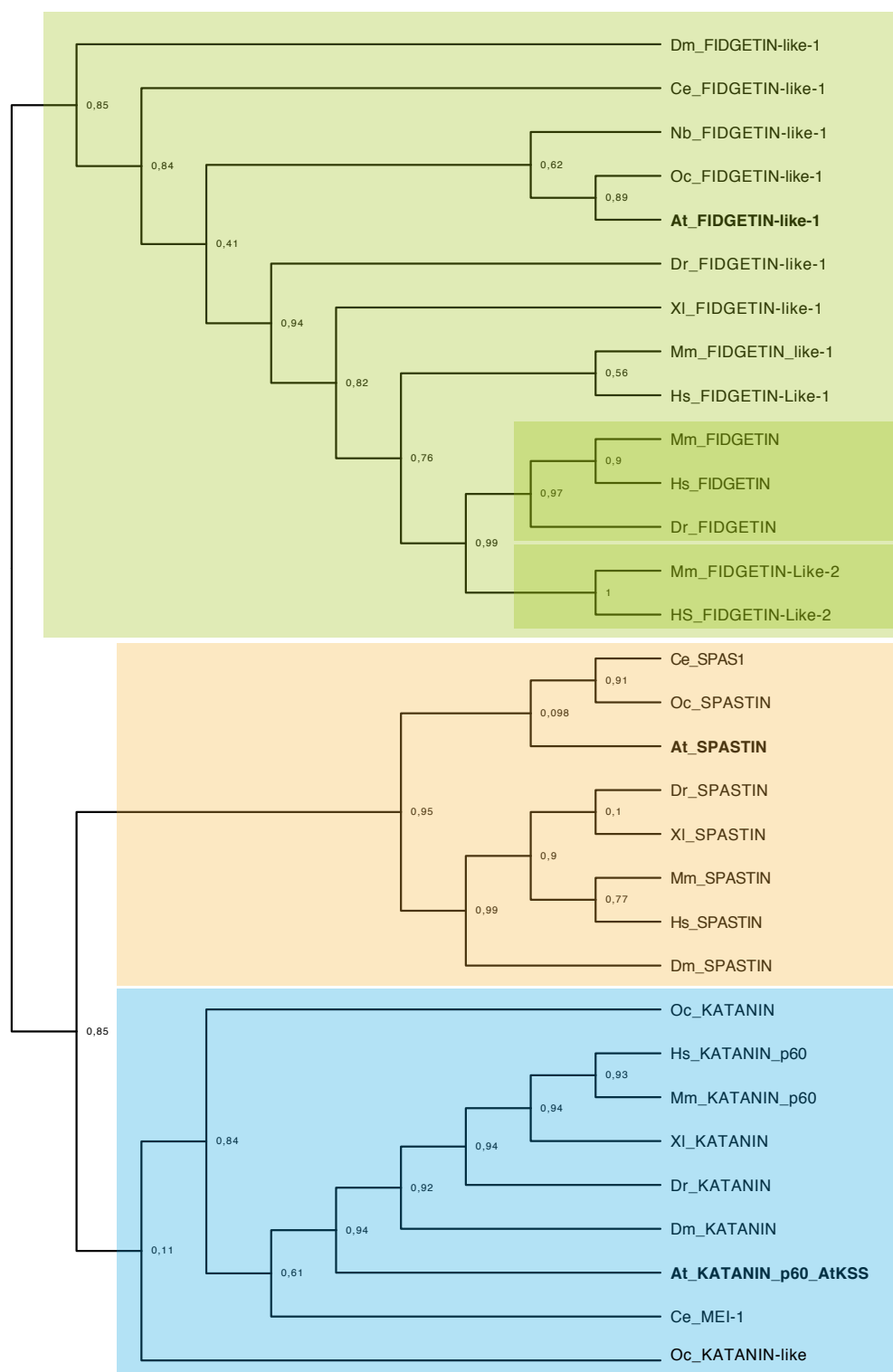


FIGURE 5.4 – **Arbre phylogénétique des protéines Katanin, Spastin et Fidgetin** réalisé par maximum de vraisemblance à partir d'un alignement en T-COFFEE sur www.phylogeny.fr. La mise en page de l'arbre a été réalisée sur Fig Tree. At : *Arabidopsis thaliana*; Hs : *Homo sapiens*; Mm : *Mus musculus*; Oc : *Ostreococcus tauri*; Ce : *Caenorhabditis elegans*; XI : *Xenopus laevis*; Dr : *Danio rerio*; Nb : *Nosema bombicis*.

la rapprochant fonctionnellement des protéines phylogénétiquement proches Katanin et Spastin.

La protéine FIGL2 a été très peu étudiée, mais pourrait être une cible pour favoriser la cicatrisation chez l'animal. Cette découverte a fait l'objet d'un dépôt de brevet (SHARP et al. 2012) mais pas de publication. La protéine FIGL2 de souris serait nucléaire, et il est donc peu probable qu'elle ait un rôle en relation avec les microtubules (YANG et al. 2005).

La question reste de savoir si la protéine FIGL1, seule conservée dans toutes les branches des eucaryotes, possède une activité de déstabilisation des microtubules. Tout d'abord, FIGL1 semble bien être une *bona fide* AAA-ATPase de par sa séquence protéique (voir aussi la partie Résultats 3). De plus, la protéine FIGL1 de *C.elegans*, seule protéine de la famille à avoir été purifiée et cristallisée, présente une conformation en hexamère (PENG et al. 2013) et possède une activité ATPase (YAKUSHIJI et al. 2004, 2006).

Chez la drosophile, FIGL1 semble avoir conservé son activité de section des microtubules. Il a été montré que DmFIGL1 désassemblerait les microtubules *ex vivo* (dans les cellules en culture) et serait impliquée dans la régulation du fuseau de division et de la progression de la mitose (ZHANG et al. 2007). Il a notamment été montré que DmFIGL1 était localisée aux kinétochores et stimulerait le flux de tubuline nécessaire à la migration des chromosomes lors de l'anaphase mitotique (flux de type "Pacman", Figure 5.5C, ZHANG et al. 2007).

Les microtubules sont des structures strictement cytoplasmiques. Chez *C.elegans*, FIGL1 est localisée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules (expériences *ex vivo* ONITAKE et al. 2012, cf. Figure 5.5D, et *in vivo* LUKE-GLASER et al. 2007), ce qui semble indiquer que CeFIGL1 pourrait avoir un rôle indépendant du cytosquelette. De même, dans les cellules en interphase chez le Trypanosome, FIGL1 est localisée dans le noyau et présente un profil ponctué (Figure 5.5E, CASANOVA et al. 2009). Dans les cellules en division, FIGL1 est relocalisée au niveau du fuseau de division, indiquant que FIGL1 pourrait avoir plusieurs rôles chez cette espèce.

Des données chez la souris et l'homme ont apporté un autre éclairage sur le rôle de FIGL1. Chez la souris, une étude s'intéressant aux déterminants génétiques du poids des testicules de souris a révélé un QTL contenant le gène FIGL1 (L'HÔTE et al. 2011). L'immunohistochimie de FIGL1 montre une localisation cytoplasmique péri-nucléaire dans les spermatocytes au stade pachytène (Figure 5.5A), ce qui pourrait impliquer un rôle méiotique de FIGL1 chez cette espèce. Au stade métaphase I, le signal apparaît autour du fuseau de division, sans pour autant le marquer, puis disparaît dans les spermatides (L'HÔTE et al. 2011). Ces données ne sont pas incompatibles avec un rôle lié aux microtubules, mais ne semblerait pas lié au fuseau de division. Chez l'Homme, FIGL1 est localisée

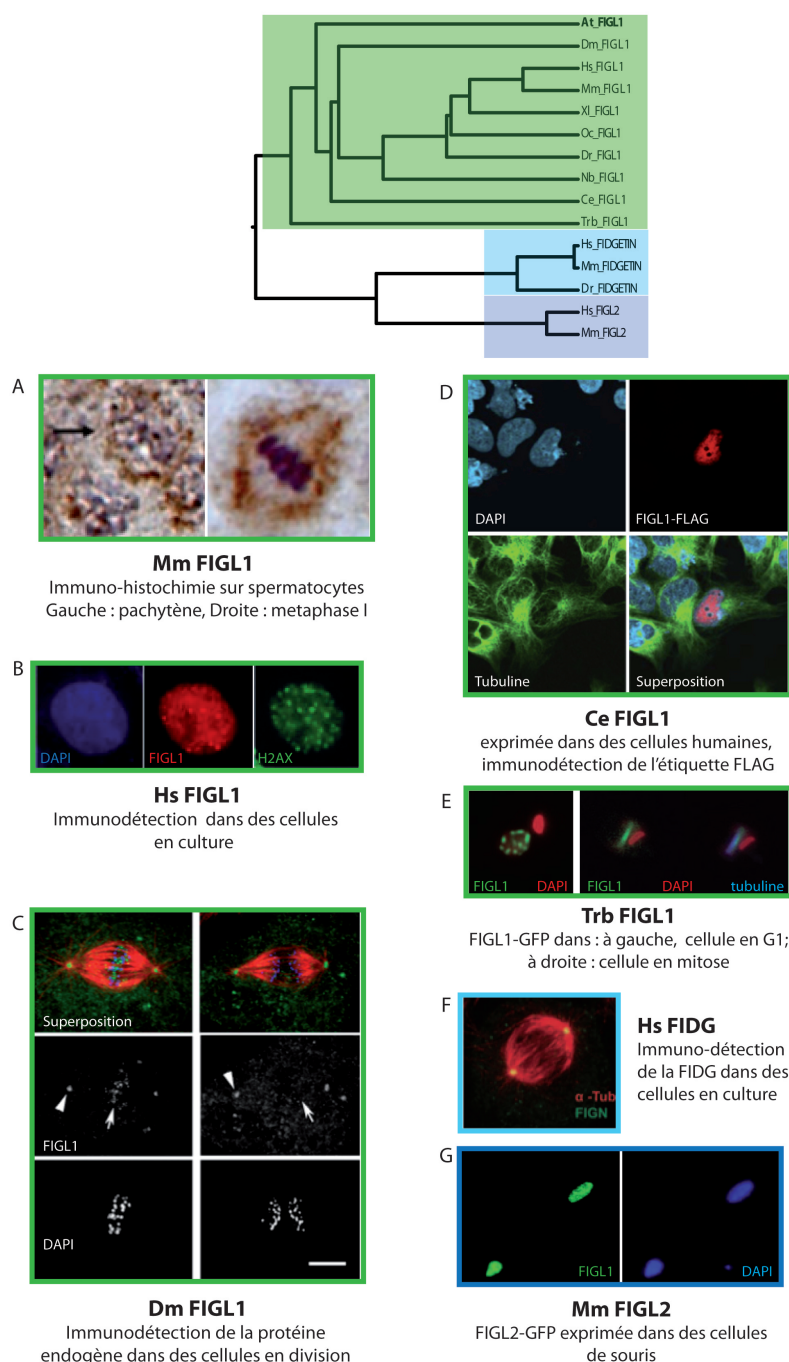


FIGURE 5.5 – **Localisation des différentes protéines Fidgetin.** En haut, arbre phylogénétique des protéines Fidgetin réalisé par maximum de vraisemblance à partir d'un alignement en T-COFFEE sur www.phylogeny.fr. La mise en page de l'arbre a été réalisée sur Fig Tree. En bas, données de localisation des différentes protéines. At : *Arabidopsis thaliana*; Hs : *Homo sapiens*; Mm : *Mus musculus*; Oc : *Ostreococcus tauri*; Ce : *Caenorhabditis elegans*; Xl : *Xenopus laevis*; Dr : *Danio rerio*; Nb : *Nosema bombicis*; Trb : *Tripanosoma brucei*. A : L'HÔTE et al. 2011; B : YUAN et al. 2013; C : ZHANG et al. 2007; D : ONITAKE et al. 2012; E : CASANOVA et al. 2009; F : MUKHERJEE et al. 2012; G : YANG et al. 2005.

dans le noyau et interagit avec RAD51 *in vivo*. Dans le noyau des cellules irradiées (qui présentent alors des cassures double-brins), FIGL1 forme des foyers qui co-localisent avec les foyers γ H₂AX (Figure 5.5B, YUAN et al. 2013). La formation de ces foyers est dépendante de protéines de la voie γ H₂AX de signalisation des cassures de l'ADN (MDC1 et RNF8), mais ne dépend pas de RAD51, tout comme les foyers RAD51 ne semblent pas dépendre de FIGL1. Cette localisation aux cassures de l'ADN se fait grâce à la partie N-terminale de la protéine (120 premiers acides aminés). L'inactivation de la protéine par shRNA induit une diminution de la viabilité des cellules comparable à celle induite par l'inactivation de RAD51, impliquant que ces deux protéines pourraient effectivement jouer dans une voie commune de réparation de l'ADN.

La liaison à RAD51 se fait via un domaine nommé FRBD (pour *FIGL1's RAD51 binding domain*), conservé chez les FIGL1 de mammifères, mais aussi du xénope, du poisson zèbre et, de façon plus surprenante, de la drosophile dont le rôle dans le désassemblage des microtubules est avéré. Ce domaine est aussi conservé chez FIGL1 d'*Arabidopsis* (voir Résultats). A l'inverse, il est absent des FIDG et FIGL2 de mammifères ce qui en fait un bon marqueur spécifique des FIGL1. Ces données semblent indiquer que FIGL1 pourrait être impliquée dans la recombinaison homologue dans les cellules somatiques.

Il est donc possible que FIGL1 ait plusieurs rôles conservés. Deux hypothèses s'ouvrent alors : (1) FIGL1 avait la potentialité d'exercer plusieurs rôles chez l'ancêtre commun et chaque espèce a recruté ces potentialités à des fins différentes ; (2) FIGL1 exerce ses différents rôles chez toutes les espèces, aucun des deux rôles n'ayant jamais été étudié simultanément chez la même espèce.

5.2.2 Pch2, une protéine du groupe BSC1 impliquée en méiose

Pch2 est une AAA-ATPase de la branche BSC1, et a été impliquée en méiose. PCH2 fut mise en évidence dans un crible supprimeur de la mutation *zip1* chez *S.cerevisiae* (SAN-SEGUNDO et al. 1999). PCH2 s'associe majoritairement aux régions non synapsées du génome au stade zygotène et il a été proposé que Pch2 contrôle la mise en place du complexe synaptonémal, et régulerait par là même le déroulement de la recombinaison et la formation des CO et des NCO (BÖRNER et al. 2008 ; JOSHI et al. 2009).

Sa structure tridimensionnelle a été récemment élucidée chez *S.cerevisiae* (CHEN et al. 2014). Pch2 s'assemble en hexamère et possède une activité ATPase indispensable à son rôle *in vivo*. Des expériences *in vitro* ont montré que Pch2 lie la protéine HOP1 (protéine de l'axe central du SC, voir 1.2.3) et est capable de dissocier la protéine HOP1 liée à l'ADN en présence d'ATP.

La recombinaison semble affectée dans les mutants *pch2* de levure. Le taux de re-

combinaison est identique au sauvage sur le petit chromosome III mais est augmenté sur les chromosomes VII, VIII et XV (60% en moyenne), et les crossovers du mutant sont dépendants à la fois de MSH5 et de MUS81 (ZANDERS et al. 2009). Les auteurs concluent aussi que le mutant *pch2* aurait un défaut d'interférence, mais ce défaut ne semble se présenter que sur une minorité des loci étudiés. Des mesure de L_{CO} ont d'ailleurs démontré que cette protéine n'était pas impliquée dans le phénomène d'interférence (ZHANG et al. 2014b). La mutation de *PCH2* entraîne une augmentation du nombre d'invasions simple brin (SEI) et de dHj (sur la sœur et l'homologue), mais pas à un nombre plus important de CO dans une étude sur un autre hotspot de CO (BÖRNER et al. 2008). Ces résultats ont été interprétés comme un défaut de turnover des intermédiaires de recombinaison, mais pourraient être vus comme une augmentation de la formation des dHj menant à l'augmentation du nombre de NCO observée. L'ensemble de ces données, bien qu'elles impliquent PCH2 dans la recombinaison méiotique, ne permet pas de définir un rôle précis de cette protéine dans la régulation de la recombinaison.

En conclusion, l'ensemble de ces données montre que les AAA-ATPases sont capables de dissocier des complexes protéiques divers, des microtubules au complexe synaptonémal, de façon ordonnée et spécifique. Leur implication dans des fonctions aussi diverses que le transport de vésicules et le développement des neurones en font des protéines centrales dans la vie d'une cellule, quand bien même la caractérisation précise de leur rôle est encore souvent parcellaire.

DEUXIÈME PARTIE

Résultats

Le constat que le nombre d'événements de CO est contraint chez un grand nombre d'espèces pose immédiatement la question : comment cette contrainte est mise en place et quels en sont les déterminants génétiques ? Pour répondre à cette question, une approche par crible génétique directe a été mise en place au sein de l'équipe Méiose et Recombinaison de l'Institut Jean-Pierre Bourgin de l'INRA de Versailles. Ces cribles ont pour but d'isoler et d'identifier les gènes et les protéines qui pourraient avoir une activité anti-crossover, et d'en étudier le mode d'action pour mettre en évidence les différentes voies de régulation.

Les mécanismes de la recombinaison homologue somatiques et méiotiques font appel à de nombreuses protéines communes. Les cribles de génétique directe sont une façon élégante de mettre en évidence de nouveaux gènes spécifiquement impliqués dans les phénomènes qui nous intéressent, ici la régulation des événements de recombinaison. C'est cette approche qui a été favorisée lors des travaux présentés ci-après. Ces cribles peuvent mener à l'identification de protéines déjà connues pour avoir un rôle dans la recombinaison ou la réparation de l'ADN, comme ce fut le cas pour FANCM (page 92) et MHF1-MHF2 (page 117). Ces cribles sans *a priori* peuvent aussi identifier de nouveaux acteurs qui n'avaient pas été précédemment impliqués dans ces mécanismes, comme ce fut le cas pour FIGL1 (page 153).

Depuis maintenant une vingtaine d'année, des cribles de génétique directe visant à identifier des mutants présentant des défauts méiotiques ont permis de mettre en évidence un grand nombre d'acteurs de la recombinaison méiotique et plus largement de la régulation de la méiose (MERCIER et al. 2008). Ces cribles sont basés sur un critère de stérilité, partielle ou complète, qui chez *Arabidopsis thaliana* est facilement observable grâce à la diminution de la longueur des fruits. C'est notamment le cas des mutants

À l'inverse, des mutations dans des gènes codant des protéines anti-CO pourraient permettre d'augmenter le nombre de CO par méiose mais ne mèneraient pas à un phénotype macroscopique particulier et ne seraient donc pas détectables par des cribles directs simples. Pour identifier de telles mutations, l'idée fut alors de mener des cribles en partant d'un mutant présentant un défaut de formation de crossover et donc quasi-stérile, puis en recherchant des mutants suppresseurs restaurant la longueur des fruits, en partant du principe que la mutation d'un gène "anti-CO" devrait rétablir un niveau de CO suffisant pour restaurer la ségrégation des chromosomes en méiose I et donc la fertilité d'un tel mutant. Ce crible est donc basé sur la même technique de détection, la longueur des fruits, mais il s'agit ici de cribler au sein d'une population de plantes stériles, les quelques plantes fertiles suppresseur. Ces cribles suppresseurs sont réalisables à deux conditions : (i) le mutant homozygote de départ doit pouvoir fournir des graines pour la mutagenèse et ne doit donc pas être complètement stérile (les mutants qui présentent de la fragmentation chromosomique sont donc à exclure); (ii) ce mutant doit cependant être suffisamment

TABLE 1 – Bilan des cribles *zmm*

Gènes	<i>zip4</i>	<i>hei10</i>	<i>msh5</i>	<i>shoc1</i>	<i>msh4</i> (Ler)	Total
Nombre de lignées criblées	2000	2000	1000	1000	1000	7000
<i>FANCM</i>	5	5	5	8	6	29
<i>MHF2</i>	1	2	0	0	0	3
<i>FIGL1</i>	2	4	3	3	2	14
En cours d'identification	0	8	0	1	8	17
Total	8	19	8	12	17	64

affecté pour qu'il soit clairement différent d'un sauvage et qu'une augmentation de la fertilité puisse être facilement détectée sur la longueur des fruits.

Cinq cribles ont été lancés sur cette idée, visant à la suppression de la quasi-stérilité de mutants *zmm* : *zip4*, *msh4*, *msh5*, *shoc1* et *hei10*. Ils ont permis d'isoler une soixantaine de supresseurs sur 7000 lignées criblées (Table II).

Lorsque j'ai intégré l'équipe Méiose et Recombinaison, un premier crible avait déjà été lancé, huit supresseurs avaient été isolés et répartis en trois groupes de complémentation. J'ai pu participer au projet de caractérisation du premier supresseur, *fancm*, ce qui m'a valu une place de deuxième auteur sur la publication associée, publiée dans le journal *Science* (CRISMANI et al. 2012). J'ai ensuite cartographié et identifié les deux autres supresseurs : *mhf2* et *figl1*. Le projet autour de *MHF2* et la voie Fanconi a été mené de front par W. Crismani et moi-même, et a été valorisé par une publication dans le journal *Nucleic Acids Research* en co-premier auteur (GIRARD et al. 2014, sous presse). Mon temps de recherche a donc principalement été dévoué au projet autour du mutant *figl1*, que j'ai identifié et caractérisé (manuscrit en cours de préparation). Parallèlement, d'autres cribles supresseurs ont été menés et ont permis l'identification d'autres allèles de *fancm*, *mhf2* et *figl1*. Un crible contre *msh4* en fond Landsberg a notamment permis l'identification de nouveaux allèles dans un fond génétique différent et de pouvoir ainsi obtenir des cartes génétiques.

L'ensemble de ces projets ont permis de mettre en évidence deux voies de régulation de la formation des crossovers en méiose chez *Arabidopsis*.

FANCM, un régulateur majeur de la formation des crossovers méiotiques

1.1 Introduction et Résumé

Le premier supprimeur étudié porte une mutation dans le gène *FANCM*. FANCM est une hélicase impliquée dans la stabilité du génome et connue pour supprimer la formation des CO dans les cellules somatiques (PRAKASH et al. 2009 ; ROSADO et al. 2009, voir aussi Introduction 4.2.1.1).

L'inactivation de FANCM est capable de restaurer le niveau de fertilité de tous les *zmm* testés (*zip4*, *msh4*, *msh5*, *shoc1* et *hei10*), et entraîne une augmentation d'un facteur 3 du nombre de CO par rapport au sauvage, mesurée sur huit intervalles répartis sur quatre des cinq chromosomes d'*Arabidopsis thaliana*. FANCM est donc une protéine anti-crossover majeure chez le sauvage. Les CO observés chez le mutant *fancm* dépendent de la formation des cassures catalysées par SPO11, mais ne proviennent pas d'un excès de cassures, comme le suggère le nombre inchangé de foyers DMC1 par rapport au sauvage. Ces extra-CO sont aussi dépendants des étapes précoces d'invasion simple brin et formation de la D-loop (catalysées par DMC1).

Ces extra-CO ne sont pas dépendants des protéines ZMM : *fancm* est capable de supprimer la semi-stérilité de tous les mutants *zmm* testés, et les extra-CO ne sont pas marqués par MLH1, un marqueur des CO de voie I. Ces données suggèrent que les extra-CO formés dans le mutant *fancm* sont dépendants de la voie II. Pour appuyer cette suggestion, l'interférence n'est plus détectable chez le mutant, suggérant que les extra-CO ne sont pas interférents. De plus, MUS81 devient essentiel à la réparation des DSB dans un fond *fancm*, comme indiqué par la fragmentation chromosomique présent chez le double mutant *fancm mus81*. Ce double mutant présente des défauts de croissance et de développement, ce qui indique que la protéine FANCM serait aussi impliquée dans la réparation de l'ADN dans les cellules somatiques. Chez *Arabidopsis*, le mutant *rad51* ne présente pas de défaut de croissance (LI et al. 2004), mais est plus sensible aux agents génotoxiques que le sauvage (BLEUYARD et al. 2004). RAD51 est important pour les

étapes précoces de la recombinaison homologue (HR) somatique et méiotique, mais ne semble pas absolument requis pour le développement de la plante en conditions normales. Les défauts de croissance du mutant *fancm mus81* sont supprimés en fond *rad51*, montrant que la réparation de l'ADN dépendante de FANCM, tout comme celle dépendante de MUS81, dépend des étapes précoces de la HR.

La découverte de *fancm* comme suppresseur des *zmm* valide donc les cribles mis en place. L'ensemble de ces données indique que FANCM est un régulateur majeur de la formation des CO méiotiques chez le sauvage. FANCM limite la formation des CO dépendants de MUS81, une voie responsable pour la formation de 15% des CO chez *Arabidopsis thaliana*. FANCM est capable de dissoudre *in vitro* des intermédiaires de recombinaison précoces, les D-loop (PRAKASH et al. 2009). Nous faisons l'hypothèse que FANCM accomplirait son rôle anti-CO en dissociant les intermédiaires de type D-loop, et enverrait ces intermédiaires dissociés vers la voie SDSA de formation des NCO.

Chez *S.pombe*, il a été montré que FML1, l'orthologue de FANCM, dirigerait aussi les intermédiaires de recombinaison vers la formation des NCO. Ces travaux ont été publiés dans la même édition du journal *Science* (LORENZ et al. 2012).

1.2 Article 1 : FANCM limits meiotic crossovers

FANCM limits meiotic crossovers

Wayne^{1,2} Crismani, Chloé Girard^{1,2}, Nicole Froger^{1,2}, Mónica Pradillo³, Juan Luis Santos³,
Liudmila Chelysheva^{1,2}, Gregory P. Copenhaver^{4,5}, Christine Horlow^{1,2}, Raphaël Mercier^{1,2*}

¹ INRA, UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

² AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

³ Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid
28040, Spain

⁴ Department of Biology and the Carolina Center for Genome Sciences, University of North
Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA.

⁵ Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina School of Medicine,
Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA.

*Correspondence to: Raphael.mercier@versailles.inra.fr

**Article published in *Science*,
June 12, 2012
PMID : 22723424**

Abstract: The number of meiotic crossovers (CO) is tightly regulated within a narrow range, despite a large excess of molecular precursors. The factors that limit CO remain largely unknown. Here, using a genetic screen in *Arabidopsis thaliana*, we identified the highly conserved FANCM helicase, which is required for genome stability in humans and yeasts, as a major factor limiting meiotic CO formation. The *fancm* mutant has a three-fold increased CO frequency compared to wild-type. These extra COs do not arise from the pathway which accounts for most of the COs in wild-type, but from an alternate normally minor pathway. Thus, FANCM is a key factor imposing an upper limit on the number of meiotic crossovers and its manipulation holds significant promise for plant breeding.

One Sentence Summary: A helicase imposes an upper limit on the number of meiotic crossovers, by limiting a normally minor crossover pathway.

Main Text:

Meiotic crossovers (COs) are necessary for balanced chromosome segregation. Recombination is initiated during meiosis by double strand break (DSB) formation, whose repair can give COs and non-crossovers (NCOs) (1). Two pathways to CO formation are known: Class I CO formation is subject to positive CO interference where one CO reduces the probability of another nearby CO (2) and depends on a group of proteins called ZMMs in addition to MLH1 and MLH3; and class II COs that depend on MUS81 and EME1/MMS4 and which are not subject to interference (1). Mammals, budding yeast and *Arabidopsis thaliana* have both classes of COs but some organisms have only one or the other (2). Factors that limit meiotic CO number must exist because DSB largely outnumber COs (*e.g.* 230 vs ~10 in *Arabidopsis* Col-0 (3)). To identify meiotic anti-CO factors, we designed a screen based on the idea that mutations which increase CO frequency, will restore the fertility of CO-defective mutants. *Arabidopsis zmm* mutants, including *zip4*, have a lack of meiotic CO, causing missegregation of homologues and thus reduced fertility leading to shorter fruit that can be visually discriminated from wild-type (3) (Figure 1). *Arabidopsis zip4* mutants still produce enough seeds, *via* random chromosome segregation, to perform a screen. *zip4-2* seeds were mutated with EMS and these developed into plants indistinguishable from *zip4*. However among ~2000 families obtained by self-fertilization, 8 lines segregated plants with increased fertility. The causal mutations were single locus, recessive and fell into three complementation groups. The first complementation group contained five lines and was further studied here (table S1). Mapping and whole genome sequencing of one suppressor (*zip4(s)1*) identified a missense mutation in the gene *Atlg35530* as the potential causal mutation (figure 2, figure S2, table S1). *Atlg35530* is the single *Arabidopsis* homologue of the human *Fanconi Anemia Complementation Group M (FANCM)* (figure S2). FANCM is

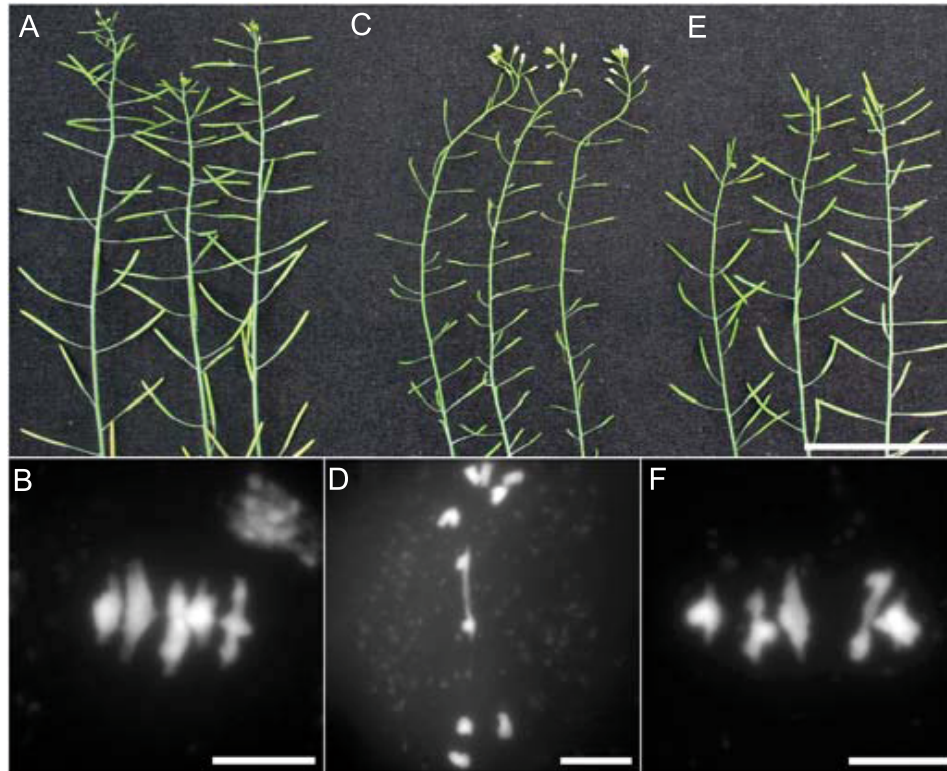


Fig. 1. A screen for genes that limit COs

Wild-type plants have long fruit (A) and five bivalents at metaphase I (B), whereas *zip4* mutants have short fruit (C) and predominantly univalents at metaphase I (D). Suppressors of *zip4* were identified based on increased fruit length (e), and confirmed to have increased bivalent formation (e). A, C, E scale bar = 5 cm. B, D, F scale bar = 5 μ m.

involved in genome stability in various eukaryotes but has no known meiotic function (4, 5). Mutations in *FANCM* were found in the four other allelic suppressors and the suppressor phenotype was recapitulated using a T-DNA insertion in *FANCM* (N620621). Three more allelic mutations in *FANCM* were identified in similar ongoing *zmm* screens (*shoc1* and *msh5*) (figure 2, figure S2). The identified mutations resulted in amino acid changes, all in well conserved residues of the helicase domain or in splicing sites (figure 2a, figure S2). The single *fancm* mutants were indistinguishable from wild-type in terms of growth and fertility (seeds per fruit: wild-type=66.3±7.8, *zip4*=2.7±1.7, *fancm-1 zip4*=44±8.4, *fancm-1*=65.6±6.5).

In wild-type, each pair of homologous chromosomes is invariably linked by a minimum of one chiasma, the cytological manifestation of meiotic CO, resulting in five bivalents at metaphase I. In *zip4*, *msh5* or *shoc1* only ~1.5 bivalents form, leaving the ~3.5 remaining pairs of homologues as univalents (figure 1 and 2b). In contrast, we see a large increase of bivalent formation in all the suppressors (figure 2b), ranging from an average of 4.5 bivalents per cell, to essentially indistinguishable from wild-type. A large increase in bivalent formation was also observed in female meiosis in *fancm-1* (figure S3) and *fancm-5* (not shown). In contrast, *fancm-1* did not restore chiasma formation of *spo11-1* or *dmcl* (figure 2), showing that chiasmata arising in *fancm* do not depend on ZMM but depend on DSBs catalyzed by SPO11-1 and strand invasion on the homologue. We then labeled chromosomes using FISH and examined the shape of metaphase I bivalents (figure S4). This technique determines if there is zero or at least one chiasma on each chromosome arm. *zip4* had a majority of chromosomes with neither arm receiving a chiasma, while wild-type, *fancm-1 zip4* and *fancm-1* had a majority of chromosomes with both arms receiving at least one chiasma (table S2). This confirms that chiasma frequency largely increased genome wide when mutating *fancm* in *zip4*, to a level approaching the upper

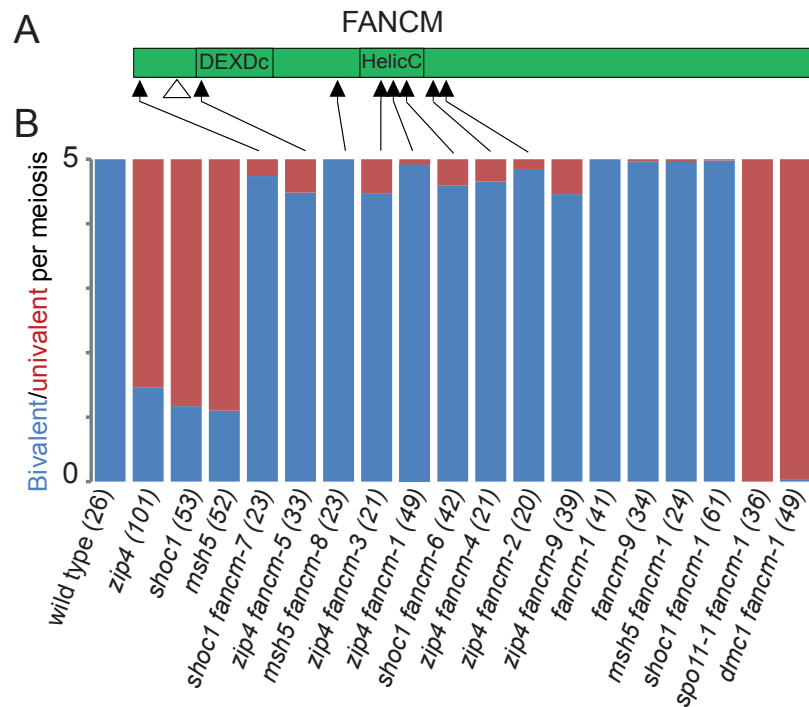


Fig. 2. FANCM mutations restore bivalent formation in zmm mutants

(A) The FANCM protein with identified mutations indicated as arrows (table S1). The open triangle indicates the position of the fancm-9 T-DNA insertion).

(B) Average number of bivalents (blue) and pairs of univalents (red) per male meiocyte. Number of cells analyzed is indicated in brackets.

limit of chiasma number that can intrinsically be detected with this technique. Recombination was therefore measured on a series of genetic intervals using tetrad-based analysis of fluorescent-tagged lines (FTLs) (6, 7) (figure 3, table S3). Recombination was decreased in all intervals by a factor of two to three in *zip4* compared to wild-type, consistent with previous findings (3). In *zip4 fancm-1* the genetic distance in the same intervals was greatly increased, by a factor of 1.9 to 3.1 compared to wild-type ($p < 10^{-5}$). This confirms that the *FANCM* mutation not only restores CO formation in the absence of ZIP4, but also, boosts CO frequency far above wild-type. In *fancm-1* (with a functional ZIP4), recombination was increased even more than in *fancm-1 zip4* by an average of 12% ($p < 0.05$ on 3 individual intervals among 6). Thus, when comparing *fancm-1* to wild-type, the genetic distance was massively increased in all eight intervals tested, by a factor ranging from 2 to 3.6 ($p < 10^{-8}$), which highlights the importance of *FANCM* in placing an upper limit on CO frequency. The difference in CO frequency between *fancm-1* and *fancm-1 zip4* is rather limited compared to the difference between *fancm-1 zip4* and wild-type, suggesting that the frequency of ZMM COs is not increased by the absence of *FANCM*. This was further supported by the result that the number of MLH1 foci, a marker of ZMM-dependent chiasmata (8), was identical in wild-type and *fancm-1* (11.8 (n=38) and 11.5 (n=49), $p=0.5$) (figure 4a and 4b). Furthermore, the chiasmata observed in *fancm-1 zip4* are not marked by MLH1 (figure 4c). In addition, the number DMC1 foci is unchanged in *fancm-1* (222 ± 52 , n=16) compared to wild-type (215 ± 37 , n=14, figure S5)(3). We cannot exclude that mutation of *FANCM* does not also increase DSB, although the unchanged number of DMC1 foci does not support this.

If the extra COs produced in the absence of *FANCM* arise through a non-ZMM pathway, as suggested by the above data, they should be insensitive to interference (2, 9). We measured

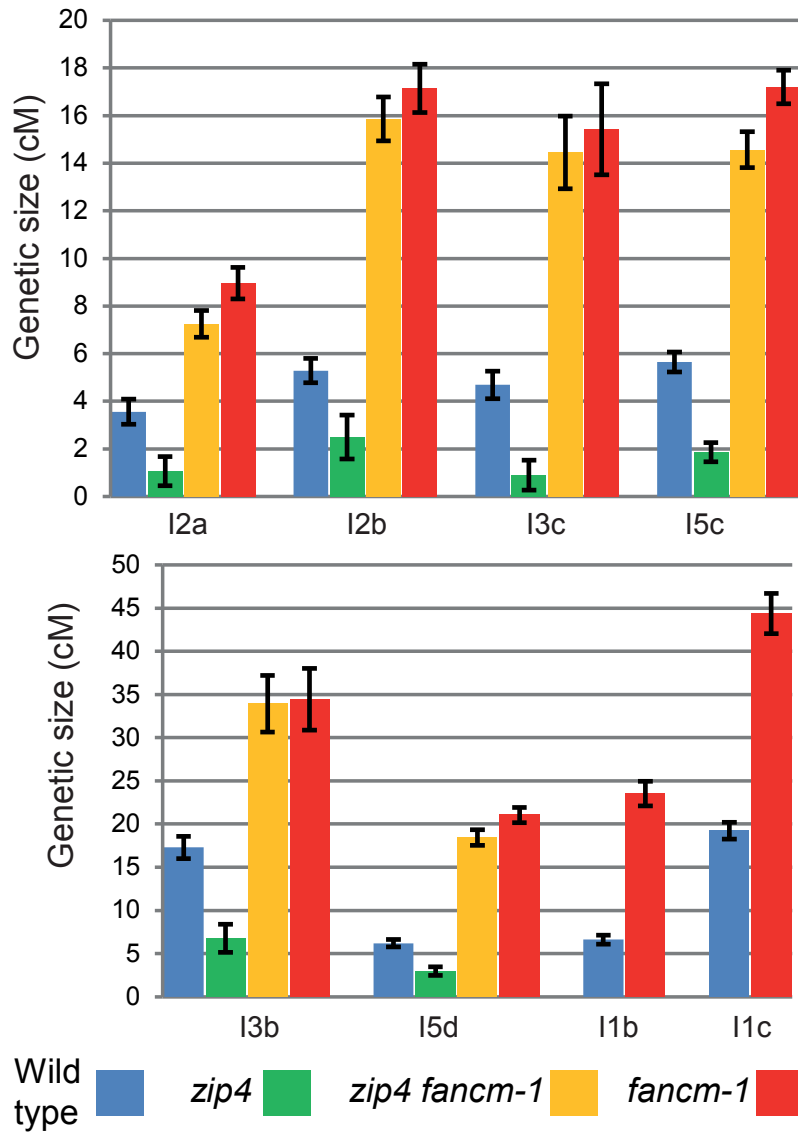


Fig. 3. Meiotic recombination is amplified in the absence of FANCM.

Genetic distances in eight intervals using fluorescent-tagged lines (FTL), were calculated with the Perkins equation (21) and are given in centiMorgans \pm S.E.. I2a and I2b are adjacent intervals on chromosome 2 and so on for the other couples of intervals as described in (6) (figure S5 and table S3).

interference between adjacent intervals (tables S4 and S5) using the interference ratio (6, 7) (table S4), which indicated strong interference in each four pairs of intervals in wild type ($p < 3.10^{-4}$). In contrast, in *fancm* and *fancm zip4* these ratios were not different from 1 (no interference), but were different from the wild-type ratios ($p < 9.10^{-3}$), indicating an absence of interference (table S4). Interference was also measured within each interval by calculating the Non Parental Ditype ratio (10), which confirmed the absence of interference in *fancm zip4* (table S5).

The extra COs arising in *fancm* are independent of ZIP4, not marked by MLH1 and not sensitive to interference. These characteristics are reminiscent of MUS81-dependent COs which are relatively minor in wild-type (11, 12). Therefore we tested whether the extra COs were MUS81-dependent, by introducing the *mus81* mutation into *fancm zip4*. Notably, *fancm mus81* or *fancm mus81 zip4* mutants have a strong growth defect. The *fancm mus81* growth defect was suppressed by mutating *rad51* (figure 4D-I). This suggests that MUS81 and FANCM have redundant roles in homologous recombination during somatic DNA repair.

Despite the growth defect, meiocytes could be obtained from *fancm zip4 mus81* and *fancm mus81* plants. While meiosis appears normal in the double *fancm zip4* or single *mus81* (figure 1F, figure S7) the triple mutation leads to a meiotic catastrophe showing an absence of bivalents at metaphase I and chromosome fragmentation at anaphase I (figure 4J), further arguing that the extra CO appearing in the *fancm* mutant, are MUS81-dependent.

In the *fancm mus81* double mutant, with a functional ZIP4, the chromosome fragmentation defect was still present at anaphase I (figure 4K), suggesting that the ZMM pathway cannot repair recombination intermediates that accumulate in the absence of both MUS81 and FANCM. However, in *fancm mus81*, unlike in *fancm zip4 mus81*, structures

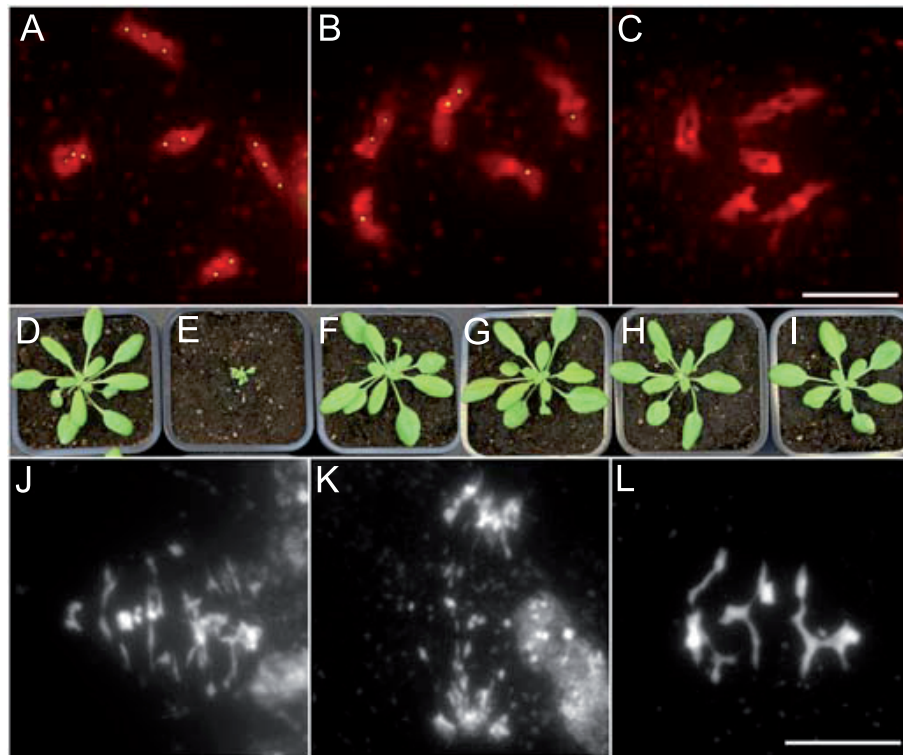


Fig. 4. *fancm* extra COs are MUS81-dependent

(A-C) MLH1 immunolocalization at diakinesis. (A) wild-type (B) *fancm-1* (C) *fancm-1 zip4*. (D-I) Analysis of the *fancm mus81* synthetic growth defect. (D) wild-type. (E) *fancm mus81*. (F) *fancm mus81 rad51* (G) *fancm mus81 zip4* (H) *fancm mus81 rad51 zip4* (I) *fancm mus81 rad51*. (J-L) Meiotic chromosome spreads. (J) *fancm-1 zip4 mus81* with chromosome fragmentation. (K, L) *fancm-1 mus81* showing chromosome fragmentation at anaphase I and five bivalent-like structures at metaphase I, respectively. Scale bars=10μm.

resembling bivalents were seen at metaphase I, before fragmentation appeared at anaphase I, suggesting the formation of chiasmata (figure 4I). In addition, a wild-type number of MLH1 foci (8) were observed at diplotene (9.9 ± 2.1 , $n=33$) and diakinesis (9.6 ± 1.8 , $n=14$) (figure S6), suggesting that the formation of ZMM-dependent CO is indifferent to the defective MUS81 FANCM pathways.

In mitotic cells, budding and fission yeast orthologs of the FANCM helicase, Mph1 and Fml1 respectively, have been shown to unwind displacement loops (D-loops) in NCO pathways and thus to be a somatic CO suppressor (13, 14). FANCM helicases biochemical properties are likely similar at mitosis and meiosis. We suggest that FANCM is able to process meiotic DSB repair intermediates, possibly D-loops, driving them towards NCO resolution (or sister chromatid events) (Figure S1). In the absence of FANCM, MUS81 is able to repair these intermediates as interference-insensitive COs, while ZMMs cannot process these intermediates as CO. This implies that recombination intermediates on which FANCM can act are distinct from the intermediates that ZMMs converts to COs, supporting an early commitment of intermediates towards the ZMM or MUS81 pathways (9). To date, only two other meiotic anti-CO factors have been described (1), R-TEL in *C.elegans* (15) and Sgs1 in budding yeast (16, 17). Thus anti-CO factors identified so far are helicases, raising the possibility that different helicases are used in various organisms to prevent excessive CO. Additionally, our findings show that, while most eukaryotes have only one to three COs per chromosome on average, CO number can be largely increased without obvious negative phenotypic effects, suggesting that COs are naturally constrained below their possible maximum. This finding supports the idea that crossover frequency is maintained by natural selection at a specific equilibrium between the long-term advantages and costs of recombination (18). Finally, the hyper-recombination provoked by

fancm mutation could be of great interest for crop improvement, that relies on the production of new allele combinations through meiotic recombination whose frequency is a limiting factor (19).

References and Notes:

1. J. L. Youds, S. J. Boulton, *Journal of cell science* **124**, 501-13 (2011).
2. L. E. Berchowitz, G. P. Copenhaver, *Current genomics* **11**, 91-102 (2010).
3. L. Chelysheva et al., *PLoS genetics* **3**, e83 (2007). 10.1371/journal.pgen.0030083
4. M. C. Whitby, *DNA Repair* **9**, 224-36 (2010).
5. A. R. Meetei et al., *Nature genetics* **37**, 958-63 (2005).
6. L. E. Berchowitz, G. P. Copenhaver, *Nature protocols* **3**, 41-50 (2008).
7. A. Malkova et al., *Genetics* **168**, 49-63 (2004).
8. L. Chelysheva et al., *Cytogenetic and genome research* **129**, 143-53 (2010).
9. G. V. Börner, N. Kleckner, N. Hunter, *Cell* **117**, 29-45 (2004).
10. F. W. Stahl, *Genetics* **179**, 701-4 (2008).
11. J. D. Higgins, E. F. Buckling, F. C. H. Franklin, G. H. Jones, *The Plant Journal* **54**, 152-62 (2008).
12. L. E. Berchowitz, K. E. Francis, A. L. Bey, G. P. Copenhaver, *PLoS genetics* **3**, e132 (2007). 10.1371/journal.pgen.0030132
13. W. Sun et al., *Molecular cell* **32**, 118-28 (2008).
14. R. Prakash et al., *Genes & development* **23**, 67-79 (2009).
15. J. L. Youds et al., *Science* **327**, 1254-8 (2010).
16. S. D. Oh et al., *Cell* **130**, 259-72 (2007).
17. A. De Muyt et al, *Molecular cell*, in press (2012).
18. L. Hadany, J. M. Comeron, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1133**, 26-43 (2008).
19. E. Wijnker, H. de Jong, *Trends in plant science* **13**, 640-6 (2008).

21. D. D. Perkins, *Genetics* **34**, 607-26 (1949).
22. N. Macaisne et al., *Current biology* **18**, 1432-7 (2008).
23. J. D. Higgins et al., *The Plant Journal* **55**, 28-39 (2008).
24. N. J. Stacey et al., *The Plant Journal* **48**, 206-16 (2006).
25. W. Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 10596-601 (2004).
26. J. Drouaud, C. Mézard, *Methods in molecular biology* **745**, 223-49 (2011).
27. K. J. Ross, P. Fransz, G. H. Jones, *Chromosome Research* **4**, 507-16 (1996).
28. E. Sanchez-Moran, S. J. Armstrong, J. L. Santos, F. C. H. Franklin, G. H. Jones, *Chromosome Research* **9**, 121-8 (2001).
29. S. J. Armstrong, A. P. P. Caryl, G. H. Jones, F. C. H. Franklin, *Journal of Cell Science* **115**, 3645-3655 (2002).
30. J. C. Motamayor et al., *Sexual Plant Reproduction* **12**, 209–218 (2000).
31. N. Macaisne, J. Vignard, R. Mercier, *Journal of cell science* **124**, 2687-91(2011).

RM thanks the EU-FP7 programme (Meiosys-KBBE-2009-222883), GPC thanks the NSF (MCB-1121563) for financial support. We thank Valérie Borde, Mathilde Grelon, Christine Mézard, Fabien Nogué, Arnaud Demuyt and Olivier Loudet for critical reading of the manuscript and helpful discussions. A provisional patent application based on the work has been filed by INRA.

Materials and Methods

Genetic material

The lines used in this study were *zip4-1*(EJD21), *zip4-2* (N568052) (1), *shoc1-1* (N557589)(22), *msh5-2* (N526553)(23), *mus81-2* (N607515)(12), *spo11-1-3* (N646172) (24), *dmc1-3* (N871769), *fancm-9* (N620621), *rad51-1*(25).

EMS Mutagenesis and mutation identification

Incubate seeds for 17 hours at room temperature in 5mL of 0.3% (v/v) EMS. Neutralize by adding 5mL of sodium thiosulfate 1M for 5min and subsequently add 3mL of water to make the seeds sink. Remove the supernatant and wash 3 times for 20 minutes with 15mL of water. Sow the seeds in soil. The genetic analysis of each suppressor was performed by back-crossing them with the corresponding *zmm* mutant. In each case the segregation of the F2 population fit with a single-locus recessive mutation. *zip4* suppressors were crossed together to test allelism. *msh5 fancm-1* and *shoc1 fancm-1* plants were constructed to test allelism with *msh5* and *shoc1* suppressors, respectively. Mapping *zip4(s)1* using a *zip4* mutant in another background (EJD21), identified a region of 7.17 Mb (10.86 Mb (ATHS0392) - 18.03Mb (MSAT1.72)) which contained the *zip4(s)1* mutation. In parallel, the genomic DNA (26) of a double homozygous *zip4(s)1 zip4* was sequenced (Illumina®, Macrogen, South Korea). A list of SNPs were generated compared to the reference genome of *Arabidopsis thaliana* (cultivar Columbia). A SNP, G to A conversion, was identified at position 13092696 on chromosome 1 in the gene *At1g35530*. Mutations in *At1g35530* were also found in all the allelic suppressors (Table S1). *zip4(s)1* was back-crossed 3 times prior to phenotypic analysis.

Cytology

Meiotic chromosome spreads have been performed as described previously (27). The FISH technique was performed according to (28). Immunolocalisations were performed as described previously (8, 29). Female meiotic cells were observed as previously described (30).

Recombination analyses

Collection of the FTL (Fluorescent Tagged Lines) data, calculation of genetic distances (Perkins equation (21)), strength of inter-interval interference (interference ratio) and statistical analyses have been performed according to Berchowitz & Copenhaver (6, 7). Strength of intra-interval interference (NPD ratio) has been calculated according to Stahl 2008 (10). Calculations have been performed based on Stahl Lab Online tools (<http://www.molbio.uoregon.edu/~fstahl/>).

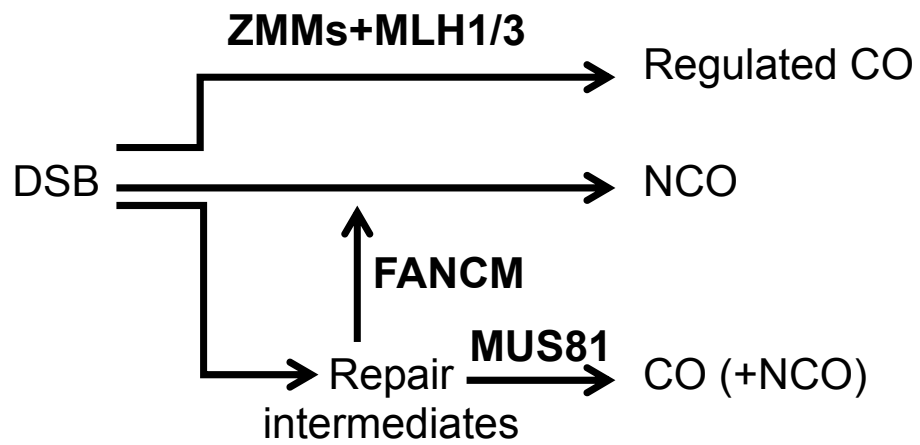


Fig. S1. Summary of the main results: FANCM limits MUS81-dependent CO.

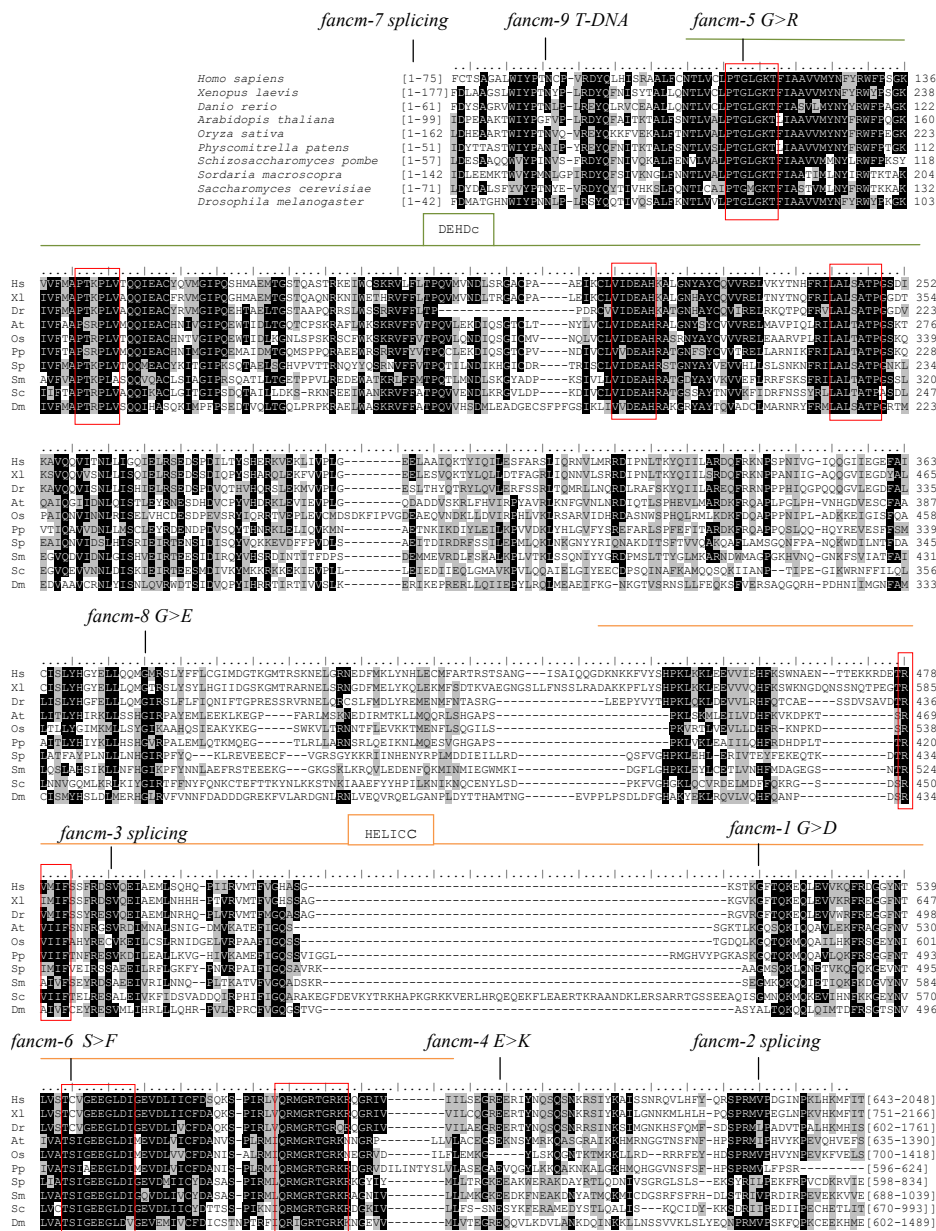


Fig. S2. A clustalW multiple alignment of the helicase region of FANCM family representatives.

Black and grey shading indicate amino acids identical or similar, respectively, (BLOSUM62) in at least six of the ten proteins. The red boxes indicate the seven conserved motifs of the SF2 helicase domain. The positions of the mutations identified in this study are shown. At At1g35530/NP_001185141.1; Hs FANCM NP_065988.1; XI NP_001171151.1; Dr NP_001107132.1; Os AAX96303.1; Pp XP_001753469.1; Sp Fml1 Q9UT23.2 ; Sc Mph1 NP_012267.1, Dm NP_650971.2

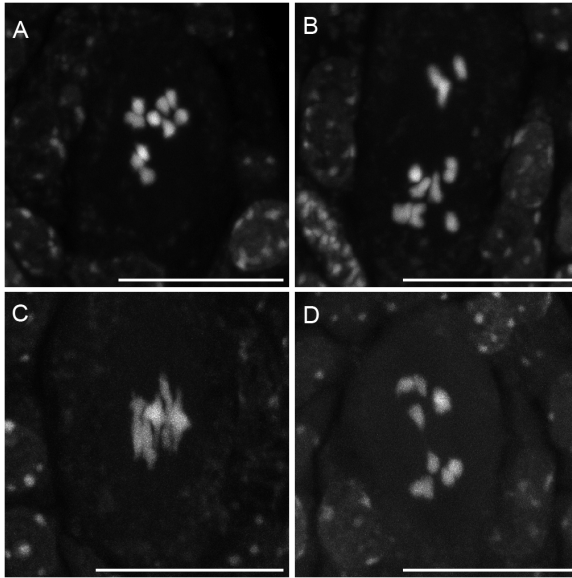


Fig. S3. *fancm-1* mutation restores bivalent formation in *zip4* at female meiosis. (A-B) *zip4* and (C-D) *fancm-1 zip4*. In *zip4*, univalents are visible at metaphase I (A), leading to unbalanced segregation at anaphase I (B). In *fancm-1 zip4* five bivalents are observed at metaphase I (C), leading to balanced segregation at anaphase I (D). Scale bars=10 μ M.

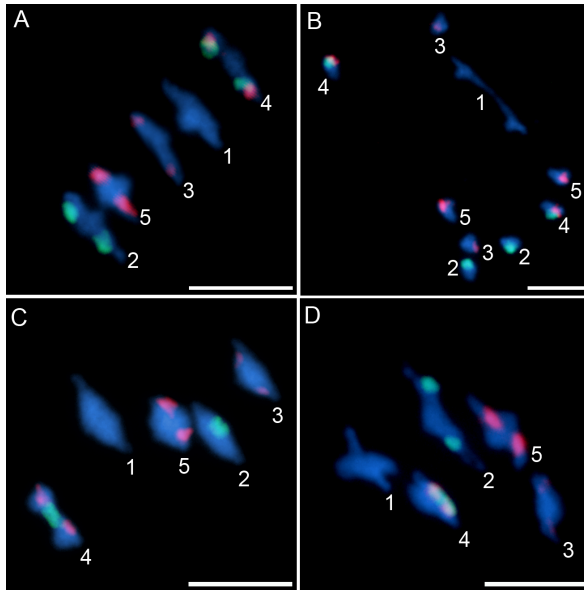


Fig. S4. FISH analysis

Chromosome morphology together with 5S (red) and 45S rDNA (green) FISH probes allow distinction of each pair of homologous chromosomes and chiasma scoring at metaphase I. Chromosome numbers are indicated. (A) Wild-type. (B) *zip4*. (C) *fancm-1* *zip4*. (D) *fancm-1*.

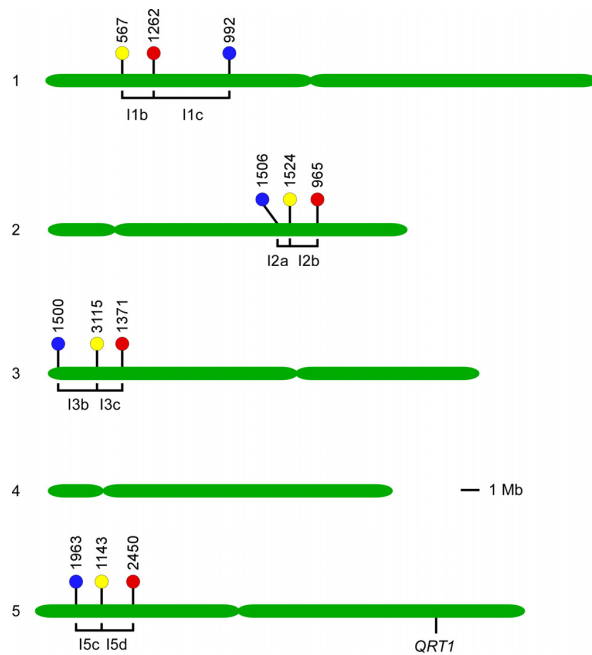


Fig. S5. Intervals for crossover and crossover interference analysis.

The position of transgenes encoding red, yellow and cyan fluorescent proteins (filled circles) are shown on the five *Arabidopsis* chromosomes (green bars) (6). Crossover frequencies and interference were measured in the intervals (black brackets) between pairs of markers. The position of the *QUARTET1* (*QRT1*) gene is also indicated. The Arabidopsis Information Resource “chromosome map tool” was used to scale the chromosomes and place the transgene insertion points on the physical map (www.arabidopsis.org).

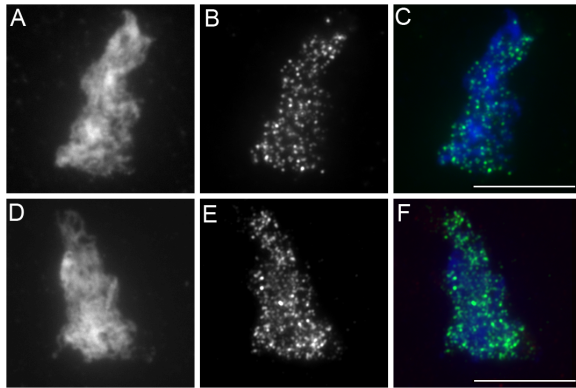


Fig. S6. DMC1 localization in wild type and *fancm*

(A to C) Wild type. (D to F) *fancm-1*. (A and D) Chromatin is revealed by DAPI. (B and E) DMC1 immunolocalization. (C and F) Merge. Scale bars=10μM.

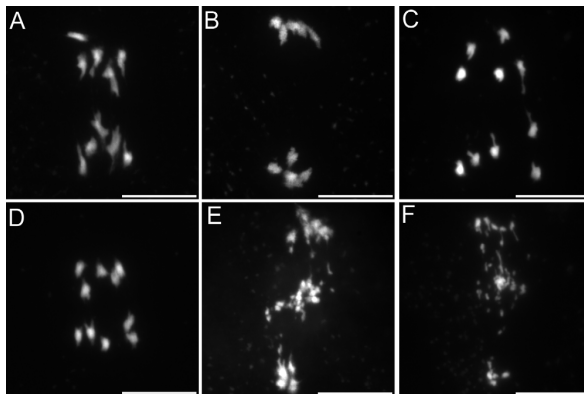


Fig. S7. Meiotic chromosome spreads at Anaphase I

(A) Wild type. (B) *fancm-1*. (C) *fancm zip4*. (D) *mus81*. (E) *rad51*. (F) *fancm mus81 rad51*. Scale bars=10 μ M.

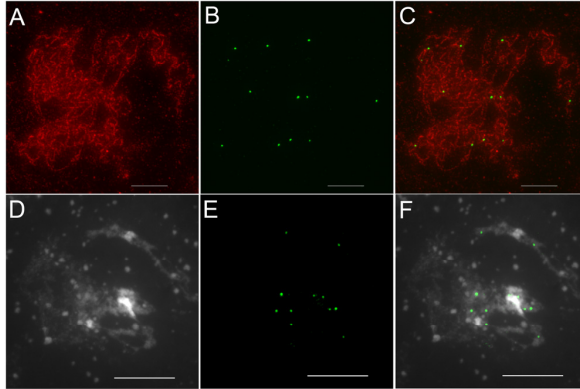


Fig. S8. MLH1 localization in *fancm mus81* double mutant.

(A) Diplotene. Chromosome axes are revealed by ASY1 immunolocalization. (B) MLH1 immunolocalization. (C) Merge. (D) Diakinesis. DNA is stained with DAPI. (E) MLH1 immunolocalization. (F) Merge. Scale bars=10 μ M

Implication de la voie Fanconi dans le contrôle de la formation des crossovers méiotiques

2.1 Introduction et Résumé

Les cribles supprimeurs des mutants *zmm* ont permis d'identifier trois allèles de *mhf2* (Table II). MHF2 est un co-facteur de FANCM au sein de la voie de réparation de l'ADN appelée voie de l'anémie de Fanconi (voie FA, voir Introduction 4.2.1.2).

MHF2 est capable de supprimer le défaut de bivalent de tous les mutants *zmm* testés (*hei10*, *msh5*, *zip4*), et le simple mutant *mhf2* présente une augmentation de 60% de la fréquence de CO par rapport au sauvage. MHF2 est donc une barrière à la formation des CO chez le sauvage. Le double mutant *mhf2 fancm* montre la même fréquence de formation de CO que le simple mutant *fancm*, indiquant que les deux protéines agissent dans la même voie pour limiter la formation des CO. Confirmant cela, les extra-CO présents chez *mhf2* présentent les mêmes caractéristiques que ceux présents chez *fancm* : ils ne dépendent pas des ZMM, ne sont pas marqués par MLH1 et diminuent le signal d'interférence. De plus, le double mutant *mhf2 mus81* présente la même fragmentation chromosomique que le double mutant *fancm mus81*. Tout ceci montre que MHF2 et FANCM limitent la formation des CO de voie II par le même mécanisme.

Cette découverte nous a poussés à regarder si les autres membres de la voie FA pouvaient avoir un rôle dans le contrôle de la fréquence de CO chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons tout d'abord identifié les partenaires de cette voie dans le génome *Arabidopsis* : en plus de FANCM et MHF2, FANCD2, FANCE, FANCL, FANCI, FANCIJ et MHF1 sont identifiables par homologie de séquence protéique chez l'arabette. Nous avons ensuite choisi des lignées d'insertion T-DNA dans chacun de ces gènes et testé la faculté de chacune de ces mutations à supprimer le manque de bivalents du mutant *msh5*. Il s'avère que, parmi les mutations testées, seule *mhf1* est capable de restaurer le niveau de bivalent, au même niveau que *mhf2*. Parmi les protéines FA testées, seule MHF1 est donc une protéine

anti-CO.

MHF1 et MHF2 jouent bien un rôle dans la même voie : le triple mutant *mhf1 mhf2 zmm* présente statistiquement le même niveau de bivalent que chacun des doubles *mhf1 zmm* et *mhf2 zmm*. Par transitivité, FANCM et ses deux cofacteurs MHF1 et MHF2, mais pas les autres protéines de la voie FA, limitent la formation des CO chez *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Article 2 : FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers

**FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2,
but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers**

Chloe Girard^{1,2*}, Wayne Crismani^{1,2*}, Nicole Froger^{1,2}, Julien Mazel^{1,2}, Afef Lemhemdi^{1,2},
Christine Horlow^{1,2}, Raphael Mercier^{1,2} ★

1. INRA UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, 78000 Versailles, France

2. AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, 78000 Versailles, France

*The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33-1-30-83-39-89. Email: raphael.mercier@versailles.inra.fr.

ABSTRACT

Genetic recombination is important for generating diversity and to ensure faithful segregation of chromosomes at meiosis. However, few crossovers are formed per meiosis despite an excess of DNA double strand break precursors. This reflects the existence of active mechanisms that limit crossover formation. We previously showed that *AtFANCM* is a meiotic anti-crossover factor. The same genetic screen now identified *AtMHF2* as another player of the same anti-crossover pathway. FANCM and MHF2 are both FA (Fanconi Anemia) associated proteins, prompting us to test the other FA genes conserved in Arabidopsis for a role in crossover (CO) control at meiosis. This revealed that among the FA proteins tested, only FANCM and its two DNA-binding co-factors MHF1 and MHF2 limit CO formation at meiosis.

INTRODUCTION

One prominent feature of eukaryotic sexual reproduction is meiosis, a specific type of cell division where two rounds of chromosome segregation follow a single round of DNA replication. This produces haploid spores from a diploid mother cell. At the first division, correct chromosome segregation relies on physical connections between homologues which are provided by crossovers. COs are reciprocal exchanges of genetic material between homologues. These events are initiated by the formation of DNA double-strand breaks (DSBs) which will be repaired by homologous recombination as COs or non-crossovers (NCOs). At least two pathways to CO formation exist with different genetic requirements. Species exist with only one of these pathways however *Arabidopsis*, humans and budding yeast for example have both (1). The first pathway, which is prominent in most species, is dependent on a group of proteins collectively referred to as ZMMs (for Zip1, Zip2, Zip3 and Zip4, Mer3 and Msh4–Msh5) and on the Mlh1–Mlh3 heterodimer, first identified in *Saccharomyces cerevisiae* and conserved in a large range of eukaryotes (2, 3). The COs that arise from this pathway are sensitive to a phenomenon known as CO interference where one CO reduces the probability of another CO occurring at adjacent loci (4). The second pathway of CO formation involves the endonuclease MUS81 and produces COs that are not sensitive to interference (1). Interestingly, CO number is relatively low in most eukaryotes, being very close to the one, obligatory, CO per chromosome pair, despite a large excess of recombination precursors (5). This suggests that active mechanisms limit CO frequency, whose molecular factors remain largely unknown. The helicase Fanconi Anemia Complementation Group M (FANCM) has been found to be a major meiotic anti-CO factor in *Arabidopsis*, limiting MUS81-dependent crossover formation, a normally minor pathway of CO formation in *Arabidopsis thaliana* (6). This function seems to be evolutionary conserved as Fml1, the

fission yeast FANCM ortholog also directs NCO formation (7).

Fanconi Anemia (FA) is a rare heritable human disease that is characterized by early onset of bone marrow failure and susceptibility to certain cancers. The FA pathway, which implicates at least 16 proteins in human cells, appears to be present in all eukaryotes and promotes genome stability by resolving blocked replication forks (8, 9). The FA genes have been initially identified as preventing FA in humans. The FA proteins can be categorized into three groups, according to their biochemical function. (1) The core complex is the first recruited to DNA stalled replication forks, using FANCM as a loading pad. Two newly discovered cofactors of FANCM, namely MHF1 and MHF2, have been shown to stimulate FANCM DNA-binding activity and its targeting to chromatin (10, 11). (2) The FA-ID complex is recruited and ubiquitinated by the core complex at the damage site. (3) The downstream partners are thought to act independently of the first two groups but have strong links with the homologous recombination machinery, and mutation of any leads to development of the disease in Human (8). Implication of FANCM in the control of meiotic CO formation raises the question whether other FA proteins limit meiotic COs, or if the FANCM meiotic function is unique among FA proteins. Here, using both forward and reverse genetic screens, we show that from a series of FA proteins conserved in Arabidopsis, only *AtMHF1* and *AtMHF2* were identified as CO-limiting factors. We propose that FANCM and its direct DNA-binding cofactors MHF1 and MHF2 prevent meiotic CO formation, without the other FA proteins being involved.

MATERIAL AND METHODS

FA protein identification

Homologs and putative homologues of FA-associated genes were identified using literature searches and reciprocal BLASTp and PSI-BLAST, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.arabidopsis.org/> and <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>.)

Genetic material

The lines used in this study were *Atmhfl-3* (N576310), *Atfanci* (N555483), *Atfancd2* (N613293), *Atfance* (N553587), *Atfancl* (37079 – was identified in the Max-Planck Institute für Züchtungsforschung collection from Köln, Germany (12)), *zip4-1* (EJD21) (13), *zip4-2* (N568052) (13), *shoc1-1* (N557589) (14), *msh5-2* (N526553) (15), *mus81-2* (N607515) (16), *spo11-1-3* (N646172) (17), *fancm-1* (6), *hei10-2* (N514624) (18). FTL lines I2ab (FTL1506/FTL1524/FTL965/*qrt1-2*) (19). Genotyping by PCR was performed with two primer pairs. The first pair is specific to the wild-type allele, and the second pair is specific to the left border of the inserted sequence as follows: *Atmhfl-3* (N576310U 5'-CCTAAACC-ATCCTCCAGCTTC-3' and N576310L 5'-CAATTTAAAGACGCAGGATCG-3', N576310L and LBSalk2 5'-GCTTTCTTCCCTTCCTTTCTC-3'); *Atfanci* (N555483U 5'-AGTCCAACACATGTCCTCCAC-3' and N555483L 5'-TGAGTTTGGTGATTTCGAAAGG-3', N555483L and LBSalk2); *Atfancd2* (N613293U 5'-AATTCACCGGAATGTCACAAC-3' and N613293L 5'-AATTCACCGGAATGTCACAAC-3', and N613293L and LBSalk2); *Atfance* (N553587U : 5'- TCAGCTGATGAAGACAGCATG-3' and N553587L 5'-ATGTCAACCCACAGAGGATTG-3', and N553587L and LBSalk2); *Atfancl* (FANCL-U 5'-ACAGAGATAAGAAGGGAAGAG-3' and FANCL-L ATTATCATTAACCCGTCATTC, and FANCL-L and LB Gabi o8409 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'). *mhf2* alleles

were genotyped by CAPS as follows : *mhf2-1* locus amplification with 5'-ATCTGCGAGCTTTTTTATTCGATTGCGATGAA-3' and 5'-AGGAGTTACGATACCAAATGA-3', subsequent digestion by MboII (104+33bp for the wild-type amplicon and 137bp for the mutant); *mhf2-2* locus amplification with 5'-AAGCGTTTATGTATTTTATAGA-3' and 5'-CTTCTGGTTCGTTTATACACT-3', subsequent digestion with BseNI (350bp for the wild-type and 330+20 for the mutant).

Atzip4(s)2 (*Atmhf2-1*) was sequenced using Illumina technology. Mutations were identified through MutDetect pipeline developed by Bioinformatics and Informatics IJPB team (Supplementary Methods).

Cytology

Meiotic chromosome spreads have been performed as described previously (20). Immunolocalisations were performed as described in (21). Observations were made using a ZEISS AxioObserver microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

zmm suppressor screens identified MHF2 as an anti-CO factor

We sought to find *Arabidopsis* mutants with increased CO-formation. However, increased meiotic CO formation does not confer any obvious macroscopic phenotype preventing easy genetic screening (6). In contrast, reduction in CO formation is easily detectable because without the physical connection provided by CO, pairs of homologous chromosomes do not associate as bivalents at metaphase I and appear cytologically as univalents that segregate randomly at anaphase I. At the macroscopic level, this lack of CO is reflected by reduced fertility easily noticed by shorter fruit. For instance, *zmm* mutants show a 75% reduction in bivalent formation and are almost sterile (2). Here we continue a previously described genetic screen, based on the idea that mutations increasing CO frequency will restore the fidelity of chromosome segregation and subsequently restore the fertility of *zmm* mutants (6). We continued the *Atzip4* (13) suppressor screen that previously revealed *AtFANCM* as an anti-CO gene. Among 2000 lines screened, eight recessive suppressors were found, falling into three complementation groups, the first of which corresponding to *FANCM* (6). The second complementation group contained one line, *zip4 suppressor 2* (*zip4(s)2*), and is the focus of this study. Map-based cloning defined a region between 27.15Mb and 30.29Mb on chromosome 1 as containing the causal mutation. Following whole genome sequencing, we identified a candidate mutation in the splice donor site of exon 2 in the gene *Atlg78790*. In parallel, we ran a second screen looking for suppressors of another *zmm* mutant, *Athei10* (18). Among 2000 lines screened, nineteen suppressors were found. Systematic sequencing of *Atlg78790* in the suppressors revealed that two lines (*hei10(s)174* and *hei10(s)170*) also contained a mutation in this gene: one non-sense mutation deleting the last five amino acids of the protein and one in the splice donor site of exon 4 (Table S1, Figure S1). The *hei10(s)174*

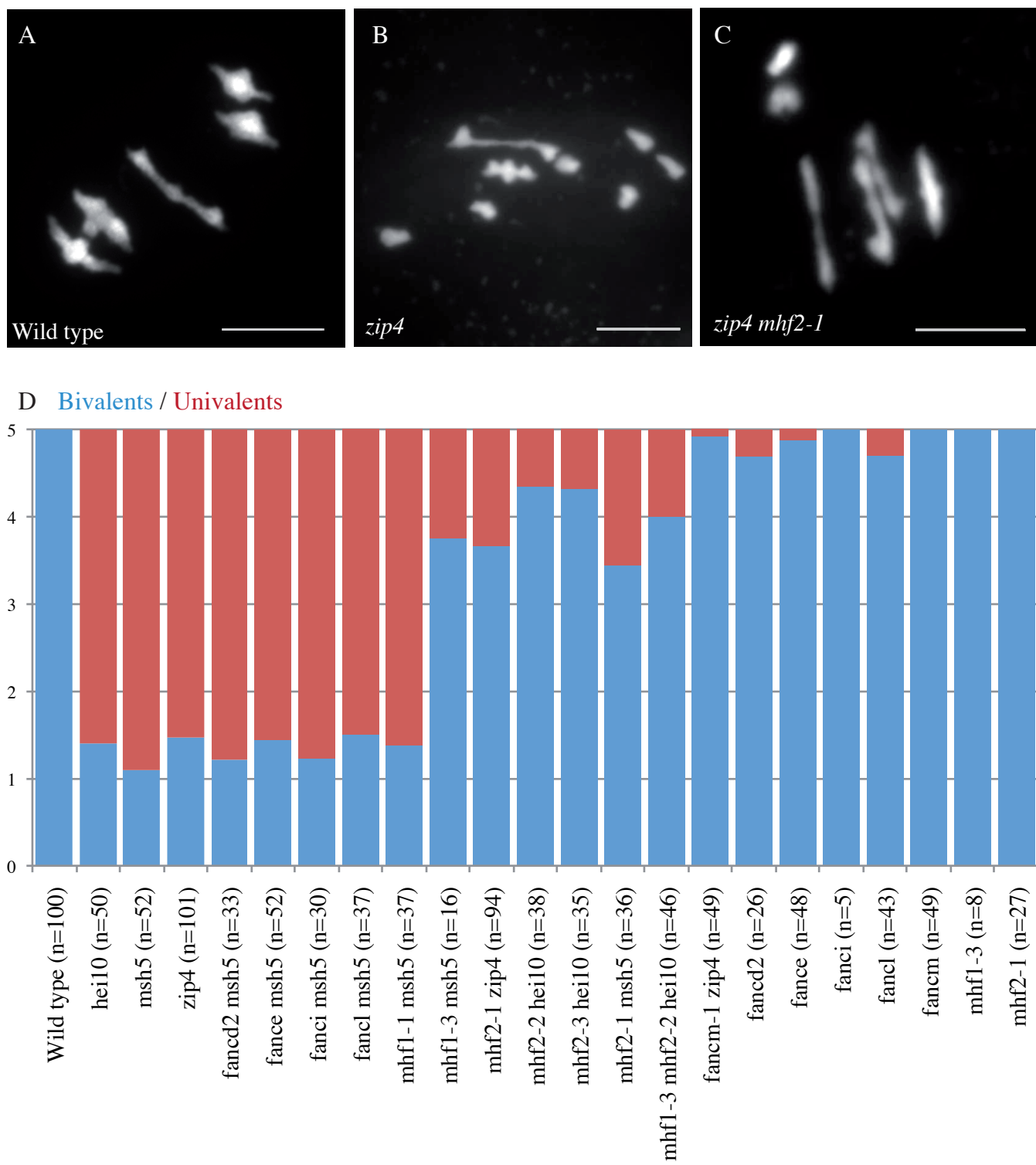


Figure 1. Bivalent formation analysis at metaphase I.

(A-C) Metaphase I chromosome spreads of male meiocytes in three representative genotypes (A) wild type, (B) *Atzip4* (C) *Atzip4 Atmhf2-1*. Scale bar=5µm. (D) Average number of bivalents (blue) and pairs of univalents (red) per male meiocyte at metaphase I. Number of cells analysed is indicated in parentheses. *fancm zip4* and *zip4* data are from (6).

and *hei10(s)170* mutations were shown to be allelic, confirming that mutations in *At1g78790* cause the fertility restoration of *zmm* mutants.

This gene encodes a protein with high similarity with mammalian *MHF2*, and reciprocal BLAST analyses showed that *At1g78790* encodes the single *MHF2* homologue in the *Arabidopsis* genome (Figure S1). We then named *At1g78790*, *AtMHF2*, and the three mutations *Atmhf2-1* (*zip4(s)2*), *Atmhf2-2* (*hei10(s)174*) and *Atmhf2-3* (*hei10(s)170*) (Table S1). Human MHF1 and MHF2 were recently identified as a heterotetramer promoting FANCM activity and participating in somatic DNA damage repair and genome maintenance (10, 11). Further, MHF1 and MHF2 have been shown to direct meiotic recombination outcome to non-crossovers in fission yeast (7).

In the three suppressors with mutations in *AtMHF2*, chromosome spreads were performed to assess the level of bivalent formation. This showed that the restored fertility was indeed associated with increased bivalent formation at metaphase I compared to their *zmm* counterpart (Figure 1), suggesting that MHF2 has an anti-CO activity at meiosis in *Arabidopsis*. The restoration of bivalent formation was not complete, the *zmm* mutants, *zmm mhf2* double mutants and wild type having ~1, ~4 and 5 bivalent pairs, respectively (Figure 1). In contrast, *Atfancm* mutation almost completely restored bivalent formation of *zmm* mutants (4.9 bivalent pairs) suggesting that mutating *AtMHF2* has a lesser anti-CO effect than mutating *FANCM* at meiosis (Figure 1).

In the single *Atmhf2* mutants, metaphase I was indistinguishable from wild type with five bivalents (Figure 1, Figure S2). Meiotic CO frequency in *Atmhf2* was then measured genetically using pollen tetrad analysis (19, 22) (Figure 2, Table S2). In the single mutants *Atmhf2-2* and *Atmhf2-1* map distances increased by ~60% compared to wild type on the two intervals tested (Z-test, $p < 6 \times 10^{-3}$), demonstrating that MHF2 is a crossover-limiting factor. This increase, while significant, is lower than what is observed in *fancm* ($p < 10^{-6}$), further

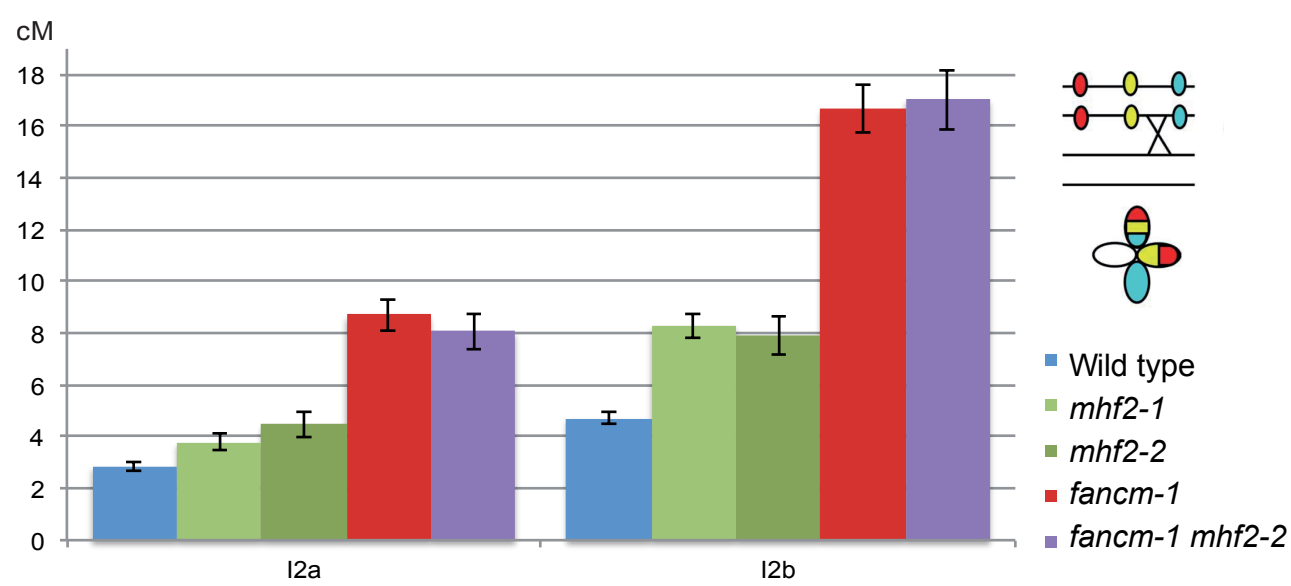


Figure 2. Genetic distances (cM) are increased in *mh2* mutants.

Genetic distances in two adjacent intervals on chromosome 2 using fluorescent-tagged lines (FTLs) (19) were calculated with the Perkins Equation (34) and are given in centiMorgans. Raw data and calculation can be found in table S2. One tetrad example and its interpretation are shown on the top right corner.

supporting the conclusion that *AtFANCM* is a more effective barrier to CO formation than *AtMHF2*

Mutations in MHF1, but not FANCL, FANCE, FANCI nor FANCD2 restore CO formation in *zmm* mutants

The identification of *AtMHF2* (this study) and *AtFANCM* (6) as factors limiting CO formation in *Arabidopsis*, prompted us to test for a similar role of other FA proteins. First, we examined the conservation of FA proteins among a selection of eukaryotes through reciprocal BLAST analysis and literature survey (Table 1). The FA proteins known in humans can be categorized into three classes, according to the cascade of events in the process of repairing blocked replication forks: the FA core complex, the FA-ID complex and the downstream factors (8, 10, 11). Many FA proteins are conserved in animals and plants, suggesting that the pathway may be conserved in these kingdoms, making *Arabidopsis* a suitable model to address the function of FA factors. In contrast, fungi seem to lack the majority of FA components. In *Arabidopsis*, unique homologues of components of the core complex (in addition to FANCM and MHF2) were identified (FANC -E, -L, MHF1), as well as all three FA-ID complex members (-D2, -I, FAN1). Among the downstream genes two unique homologues were identified (-D1, -O), and a third possesses two homologues organized as a tandem duplication (-J). No putative homologues were found for the other FA members (Table 1). For MHF1, two genes predictions corresponding to the same locus are present in the *Arabidopsis* databases: AT5E46180 (23) and AT5G50930.1 (24) but it has recently been shown that only the transcript corresponding to AT5E46180 exists *in vivo* (25).

We analysed mutant lines in the three members of the core complex (*AtMHF1*, *AtFANCE*, *AtFANCL*) and two members of the FA-ID complex (*AtFANCD2*, *AtFANCI*) (see Methods).

Table 1. Conservation of FA proteins among a selection of eukaryotes. Experimentally tested and putative homologues based on sequence similarity are shown.

"-": No gene encoding protein with significant similarity was found.

"*" Experimental evidence of a role in DNA repair

	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
FA Core Complex	FANCA (8)	-	-	-	-	-
	FANCB (35)	-	-	-	-	-
	FANCC (8)	-	-	-	-	-
	FANCE (8)	FANCE (At4g29560)	-	-	-	-
	FANCF (36)	-	-	-	-	-
	FANCG/XRCC9 (8)	-	-	-	-	-
	FANCL (8)	FANCL (At5g65740 (37))	-	-	FANCL (38)*	-
	FANCM/FAAP250 (8)	FANCM (At1g35530 (6, 39)*)	Mph1(40, 41)*	Fml1(7, 42)*	FANCM (38)	FANCM-1/DRH3 (43, 44)*
	MHF1/CENP-S/FAAP16 (10, 11)	MHF1 (At5g50930) (25)	Mhf1 (10)*	Mhf1 (7)*	-	MHF1 (Y48E1C.1)
	MHF2/CENP-X/FAAP10 (10, 11)	MHF2 (At1g78790)	Mhf2 (10)*	Mhf2 (7)*	-	MHF2 (F35H10.5)
	FAAP20 (45)	-	-	-	-	-
	FAAP24 (46)	-	-	Faap24	-	-
	FAAP100 (47)	-	-	-	-	-
FA-ID and FAN1	FANCI (8)	FANCI (At5g49110)	-	-	FANCI	FANCI-1 (43, 44)*
	FANCD2 (8)	FANCD2 (At4g14970 (37))	-	Fancd2	FANCD2 (38)*	FACD-2 (43, 44, 48, 49)*
	FAN1(8)	FAN1 (At1g48360)	-	Fan1 (50)*	-	FAN-1(51-53)*
FA downstream partners	FANCD1/BRCA2(8)	FANCD1 (At5g01630 &At4g00020 (28)*)	-	-	BRCA2 (54)*	BRC-2 (44, 55)*
	FANCI/BRIP1/BACH1(8)	FANCI (At1g20720 & At1g20750 (56))	-	-	-	DOG-1 (57)*
	FANCN/PALB2 (8)	-	-	-	-	-
	FANCO/RAD51C (8)	FANCO/RAD51C (At2g45280(26, 27, 58)*)	-	-	Spindle D (59)*	RFS-1/RAD51C(60)*
	FANCP/SLX4/BTBD12 (61)	-	Slx4(62)*	Slx4 (63)*	MUS312 (64, 65)*	HIM-18/SLX4 (66)*
	FANCF/ERCC4/XPF/RAD1 (67)	FANCF/RAD1 (At5g41150 (30, 68)*)	Rad1(69)*	Rad16(70)*	MEI9 (65)*	XPF (66)*

For each targeted gene, we identified a T-DNA insertion that disrupts the genomic coding sequence (Figure S3). We did not analyse the downstream partners AtFANCD1/BRCA2 and AtFANCO/RAD51C because they are essential for the repair of meiotic recombination intermediates in *Arabidopsis* and CO formation (26–28), and are therefore unlikely candidates for a role in limiting meiotic COs that could be detected. We did not analyse *FANCI* either, because it is present as a tandem duplication, making its mutation unrealistic to obtain. None of the tested lines showed any obvious somatic defects. Meiosis was indistinguishable from wild type on chromosome spreads in *Atmhf1*, as shown above for *Atmhf2* (Figure S2). This contrasts with the situation in fission yeast where MHF1/CENP-S and MHF2/CENP-X are required for balanced segregation of chromosomes at meiosis, through the establishment of proper kinetochore function, independently of FANCM and recombination (29). However a low frequency of univalents was detected in *Atfancd2*, *Atfance*, *Atfanci* and *Atfancl*, suggesting that these genes may have a minor role in promoting crossover formation (Figure 1D and Figure S2).

To assess the putative anti-CO activity of these genes we tested if their mutation could suppress the *zmm* lack of bivalents, as do the mutation in the genes *FANCM* and *MHF2*. For each T-DNA line, we obtained a double mutant with either *Atmsh5* or *Athei10* (15, 18). None of the mutations of *AtFANCE*, *AtFANCL*, *AtFANCD2*, *AtFANCI* (Figure 1) nor *AtFANCO/RAD1* (30) increased the number of bivalent in a *zmm* background. Even if we cannot formally exclude that some activity could be retained in the T-DNA mutants (although it appears unlikely in view of the positions of the 4.5kb T-DNA insertions, Figure S3), these results suggest that these FA genes do not have any anti-CO activity like *FANCM* and *MHF2*. In contrast, the double mutant *Atmhf1-3 Atmsh5* showed a large increase of bivalent formation compared to *Atmsh5* (Figure 1), showing that *AtMHF1* possesses a meiotic anti-CO function. The *Salk_119435* insertion (*mhf1-1* in (25)), which is inserted 41 base pairs in 3' of the ATG

was unable to restore bivalent formation of *Atmsh5*. This suggests that a functional MHF1 protein is produced at meiosis in this line.

The effect of *AtMHF1* depletion at meiosis was similar to that of *AtMHF2*, and thus weaker than that of *FANCM*, suggesting that like *MHF2*, *MHF1* is a less efficient barrier to CO formation than *FANCM*. In summary, these data suggest that only a subset of the FA associated proteins, namely *FANCM*, *MHF1* and *MHF2*, are involved in limiting meiotic crossovers.

MHF1, MHF2 and FANCM act in the same pathway to limit meiotic COs.

We then tested whether *AtMHF1*, *AtMHF2* and *AtFANCM* act in the same pathway to limit meiotic COs. First, a triple mutant *hei10 mhf1 mhf2* showed the same level of bivalent formation compared to *msh5 mhf1*, *msh5 mhf2*, or *hei10 mhf2* (Figure 1D), suggesting that *AtMHF1* and *AtMHF2* act in the same pathway. As *fancm* mutation restores bivalent formation of *zmm* mutants to near wild-type levels, it cannot be tested if bivalent formation can be restored further in combination with *mhf1* or *mhf2*. This limitation can be overcome by measuring genetic crossover formation. We therefore tested the effect of mutating both *AtFANCM* and *AtMHF2*, using tetrad analysis on one pair of adjacent intervals (I2a/I2b) (Figure 3). The genetic distances in *Atfancm Atmhf2-2* double mutant was higher than wild type (Z-test, $p < 10^{-5}$) and *Atmhf2-2* (Z-test, $p < 10^{-4}$), but not different from *Atfancm* ($p > 0.05$), demonstrating that *AtFANCM* and *AtMHF2* limit COs in the same genetic pathway. This predicts that the extra COs in an *Atmhf2* mutant would arise from the class II pathway, as described for *Atfancm* (6). Consistently, the number of MLH1 foci per cell, a marker of class I, ZMM-dependent COs, are unchanged in *Atmhf2-1* compared to wild type [9.2 ± 1.7 (n = 21) and 8.9 ± 1.4 (n = 16), $p = 0.54$] (Figure S4). Further, as class II COs do not display

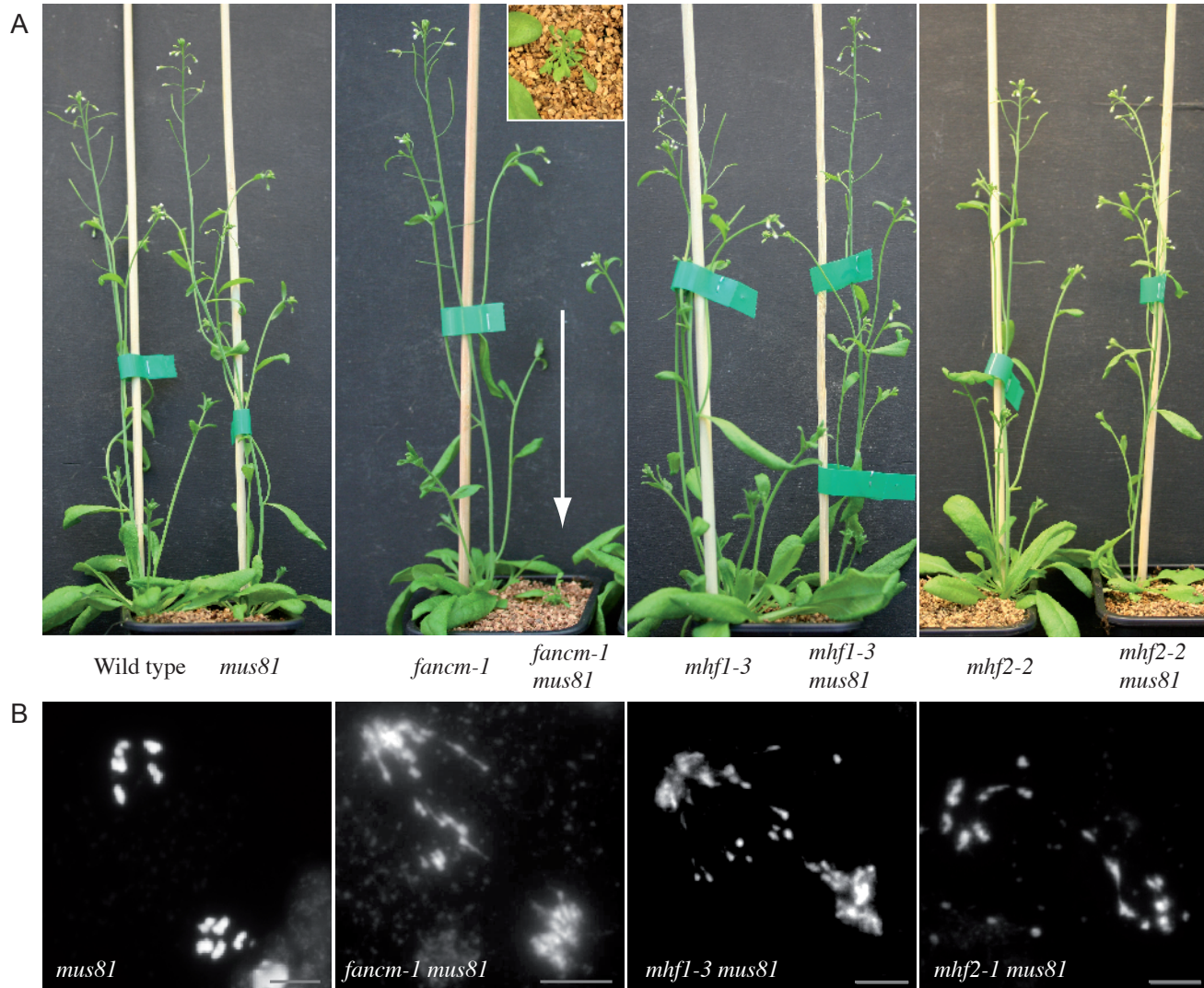


Figure 3. Genetic interaction of *Atmhf1*, *Atmhf2* and *Atfancm* with *Atmus81*.

(A) Six weeks old plants are shown with the corresponding genotype indicated below. The arrow points to the sick *Atfancm Atmus81* double mutant for which an enlargement (top view) is shown. (B) Anaphase I chromosome spreads. Chromosome fragmentation can be observed in *Atfancm-1 Atmus81*, *Atmhf1-3 Atmus81* and *Atmhf2-1 Atmus81*. Scale bar = 5 μ m.

interference, interference should be impaired in *Atmhf2* mutants. We used the tetrad data set to analyse interference through the estimation of the interference ratio (IR) (Table S2). IR measures the effect of having recombination in one interval on the genetic distance of the adjacent interval. IR is close to 0 when having COs in one interval prevents CO formation in the adjacent interval, thus indicating positive interference; IR = 1 when interference is absent (22). Interference was detected in wild-type (Interference Ratio I2b/I2a = 0.37; $p(\text{IR} = 1) = 1.2 \cdot 10^{-6}$) but was undetectable in *Atmhf2-1* (IR I2b/I2a = 0.89 ; $p = 0.6$) and *Atmhf2-2* (IR I2b/I2a = 1.02; $p(\text{IR} = 1) = 0.9$) (Table S2C). Finally, as MUS81 promotes class II CO, we produced *Atmhf1-3 Atmus81* and *Atmhf2-1 Atmus81* double mutants (Figure 3). In these double mutants, chromosome fragmentation was observed at anaphase I, while this is not the case for the respective single mutants; *Atmhf1*, *Atmhf2* and *Atmus81* (Figure 3B). This shows that in absence of MHF1 or MHF2, MUS81 becomes necessary for efficient repair of DNA double-strand breaks. This is reminiscent of the *Atfancm Atmus81* meiotic defects (6). Altogether this confirms that MHF1 and MHF2 act in the same pathway of FANCM to restrain class II meiotic CO. However, based on the partial restoration of bivalent formation in a *zmm* context (Figure 1) and on the measurement of recombination levels (Figure 2), it appears that MHF1 and MHF2 have a less prominent role than FANCM in limiting CO. While *Atfancm-1 Atmus81* plants are barely viable (6), growth and development of *Atmhf1-3 Atmus81* and *Atmhf2-1 Atmus81* plants did not have the same synthetic growth defect (Figure 3) until they enter into the reproductive phase and have reduced fertility. Similar results have been reported by Dangel and colleagues (25). This suggests that MHF1 and MHF2 have a less important role than FANCM in the repair of somatic DNA damage, as they have a less important role in limiting meiotic crossovers. Similarly, in human HeLa cells, the absence of MHF1 or MHF2 leads to less severe genotoxic agent sensitivity than the absence of FANCM (10). Further, the MHF1 and MHF2 form a hetero-tetramer that enhances FANCM DNA

binding and DNA branch migration activity *in vitro* but FANCM alone retains some activity independently of these two co-factors (10, 11, 31, 32). We thus propose that during meiosis, MHF1 and MHF2 support the FANCM helicase anti-CO activity, but that FANCM is able to function partially in the absence of MHF1/MHF2. The other conserved members of the FA pathway, including the members of the core complex, do not seem to play a role in the FANCM-MHFs anti-CO activity. It has been previously suggested that FANCM, in addition to being a core component of the FA pathway, also has a function in somatic DNA repair independently of the FA pathway (discussed in (33)). Here we showed that the FANCM-MHF1-MHF2 module ensures a specific function as a barrier to CO formation in meiosis.

Acknowledgements

We wish to thank Mathilde Grelon and Christine Mezard for critical reading of the manuscript. We wish to thank Gregory Copenhaver for providing the FTL lines and Vincent Colot for access to sequencing facilities. We also thank Delphine Charif, Fabienne Garnier, Joseph Tran and Najla Ben Hassine for developing the MutDetect pipeline

Fundings

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement numbers KBBE-2009-222883 (MeioSys) and ERC 2011 StG 281659 (MeioSight).

The authors declare that they have no conflict of interest

References

1. Youds, J.L. and Boulton, S.J. (2011) The choice in meiosis – defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *Response*, 10.1242/jcs.074427.
2. Lynn, A., Soucek, R. and Börner, G.V. (2007) ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. *Chromosom. Res.*, **15**, 591–605.
3. Osman, K., Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J. and Franklin, F.C.H. (2011) Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **190**, 523–544.
4. Berchowitz, L.E. and Copenhaver, G.P. (2010) Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr. Genomics*, **11**, 91–102.
5. Henderson, I.R. (2012) Control of meiotic recombination frequency in plant genomes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 556–61.
6. Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C. and Mercier, R. (2012) FANCM limits meiotic crossovers. *Science (80-.)*, **336**, 1588–1590.
7. Lorenz, A., Osman, F., Sun, W., Nandi, S., Steinacher, R. and Whitby, M.C. (2012) The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science (80-.)*, **336**, 1585–8.
8. Deakyne, J.S. and Mazin, A. V (2011) Fanconi anemia: at the Crossroads of DNA repair. *Biochem.*, **76**, 36–48.

9. Kottemann, M.C. and Smogorzewska, A. (2013) Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*, **493**, 356–63.
10. Yan, Z., Delannoy, M., Ling, C., Daele, D., Osman, F., Muniandy, P.A., Shen, X., Oostra, A.B., Du, H., Steltenpool, J., et al. (2010) A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol. Cell*, **37**, 865–878.
11. Singh, T.R., Saro, D., Ali, A.M., Zheng, X.-F., Du, C., Killen, M.W., Sachpatzidis, A., Wahengbam, K., Pierce, A.J., Xiong, Y., et al. (2010) MHF1-MHF2, a Histone-Fold-Containing Protein Complex, Participates in the Fanconi Anemia Pathway via FANCM. *Mol. Cell*, **37**, 879–886.
12. Ríos, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jásik, J., Winter, J., Ferrando, A., et al. (2002) Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J.*, **32**, 243–53.
13. Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M.-P., Mercier, R. and Grelon, M. (2007) Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.*, **3**, e83.
14. Macaisne, N., Novatchkova, M., Peirera, L., Vezon, D., Jolivet, S., Froger, N., Chelysheva, L., Grelon, M. and Mercier, R. (2008) SHOC1, an XPF Endonuclease-Related Protein, Is Essential for the Formation of Class I Meiotic Crossovers. *Curr. Biol.*, **18**, 1432–1437.

15. Higgins, J.D., Vignard, J., Mercier, R., Pugh, A.G., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (2008) AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in *Arabidopsis thaliana*, but is not required for synapsis. *Plant J.*, **55**, 28–39.
16. Berchowitz, L.E., Francis, K.E., Bey, A.L. and Copenhaver, G.P. (2007) The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet.*, **3**, e132.
17. Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. (2006) *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.*, **48**, 206–16.
18. Chelysheva, L., Vezon, D., Chambon, A., Gendrot, G., Pereira, L., Lemhemdi, A., Vrielynck, N., Le Guin, S., Novatchkova, M. and Grelon, M. (2012) The *Arabidopsis* HEI10 is a new ZMM protein related to Zip3. *PLoS Genet.*, **8**, e1002799.
19. Berchowitz, L.E. and Copenhaver, G.P. (2008) Fluorescent *Arabidopsis* tetrads : a visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets. **3**, 41–50.
20. Ross, K.J., Fransz, P. and Jones, G.H. (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosom. Res.*, **4**, 507–16.
21. Chelysheva, L., Grandont, L., Vrielynck, N., le Guin, S., Mercier, R. and Grelon, M. (2010) An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenet. Genome Res.*, **129**, 143–53.

22. Malkova, A., Swanson, J., German, M., McCusker, J.H., Housworth, E. a, Stahl, F.W. and Haber, J.E. (2004) Gene conversion and crossing over along the 405-kb left arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Genetics*, **168**, 49–63.
23. Dèrozier, S., Samson, F., Tamby, J.-P., Guichard, C., Brunaud, V., Grevet, P., Gagnet, S., Label, P., Leplé, J.-C., Lecharny, A., et al. (2011) Exploration of plant genomes in the FLAGdb++ environment. *Plant Methods*, **7**, 8.
24. Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., et al. (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D1202–10.
25. Dangel, N.J., Knoll, A. and Puchta, H. (2014) MHF1 plays FANCM-dependent and - independent roles in DNA repair and homologous recombination in plants. *Plant J.*, 10.1111/tpj.12507.
26. Abe, K., Osakabe, K., Nakayama, S., Endo, M., Tagiri, A., Todoriki, S., Ichikawa, H. and Toki, S. (2005) Arabidopsis RAD51C Gene Is Important for Homologous Recombination in Meiosis and Mitosis. *Plant Physiol.* , **139** , 896–908.
27. Li, W., Yang, X., Lin, Z., Timofejeva, L., Xiao, R., Makaroff, C.A. and Ma, H. (2005) The AtRAD51C Gene Is Required for Normal Meiotic Chromosome Synapsis and Double-Stranded Break Repair in Arabidopsis. *Plant Physiol.* , **138** , 965–976.

28. Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Gérard, E., Takvorian, N. and Doutriaux, M.-P. (2004) Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *EMBO J.*, **23**, 1392–1401.
29. Bhattacharjee, S., Osman, F., Feeney, L., Lorenz, A., Bryer, C. and Whitby, M.C. (2013) MHF1-2/CENP-S-X performs distinct roles in centromere metabolism and genetic recombination. *Open Biol.*, **3**, 130102.
30. Crismani, W., Portemer, V., Froger, N., Chelysheva, L., Horlow, C., Vrielynck, N. and Mercier, R. (2013) MCM8 is required for a pathway of meiotic double-strand break repair independent of DMC1 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.*, **9**, e1003165.
31. Tao, Y., Jin, C., Li, X., Qi, S., Chu, L., Niu, L., Yao, X. and Teng, M. (2012) The structure of the FANCM–MHF complex reveals physical features for functional assembly. *Nat. Commun.*, **3**, 782.
32. Yang, H., Zhang, T., Tao, Y., Wu, L., Li, H.-T., Zhou, J.-Q., Zhong, C. and Ding, J. (2012) *Saccharomyces Cerevisiae* MHF Complex Structurally Resembles the Histones (H3-H4)(2) Heterotetramer and Functions as a Heterotetramer. *Structure*, **20**, 364–70.
33. Whitby, M.C. (2010) The FANCM family of DNA helicases/translocases. *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 224–36.
34. Perkins, D.D. (1949) Biochemical Mutants in the Smut Fungus *Ustilago Maydis*. *Genetics*, **34**, 607–26.

35. McCauley, J., Masand, N., McGowan, R., Rajagopalan, S., Hunter, A., Michaud, J.L., Gibson, K., Robertson, J., Vaz, F., Abbs, S., et al. (2011) X-linked VACTERL with hydrocephalus syndrome: further delineation of the phenotype caused by FANCB mutations. *Am. J. Med. Genet. A*, **155A**, 2370–80.
36. De Winter, J.P., Rooimans, M.A., van Der Weel, L., van Berkel, C.G., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., de Groot, J., Zhi, Y., Waisfisz, Q., Pronk, J.C., et al. (2000) The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat. Genet.*, **24**, 15–6.
37. Meetei, A.R., Yan, Z. and Wang, W. (2004) FANCL Replaces BRCA1 as the Likely Ubiquitin Ligase Responsible in *ce. N ot fo is tr ib ut. Cell cycle*, **3**, 179–181.
38. Marek, L.R. and Bale, A.E. (2006) Drosophila homologs of FANCD2 and FANCL function in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1317–26.
39. Knoll, A., Higgins, J.D., Seeliger, K., Reha, S.J., Dangel, N.J., Bauknecht, M., Schröpfer, S., Franklin, F.C.H. and Puchta, H. (2012) The Fanconi Anemia Ortholog FANCM Ensures Ordered Homologous Recombination in Both Somatic and Meiotic Cells in Arabidopsis. *Plant Cell*, **1**, 1–18.
40. Scheller, J., Schürer, A., Rudolph, C., Hettwer, S. and Kramer, W. (2000) MPH1 , A Yeast Gene Encoding a DEAH Protein , Plays a Role in Protection of. *Genetics*, **7**, 1069–1081.
41. Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J.E., Sung, P., et al. (2009) Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev.*, **23**, 67–79.

42. Sun, W., Nandi, S., Osman, F., Ahn, J.S., Jakovleska, J., Lorenz, A. and Whitby, M.C. (2008) The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell*, **32**, 118–128.
43. Lee, K.Y., Chung, K.Y. and Koo, H.-S. (2010) The involvement of FANCM, FANCI, and checkpoint proteins in the interstrand DNA crosslink repair pathway is conserved in *C. elegans*. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 374–82.
44. Youds, J.L., Barber, L.J. and Boulton, S.J. (2009) *C. elegans*: a model of Fanconi anemia and ICL repair. *Mutat. Res.*, **668**, 103–16.
45. Leung, J.W.C., Wang, Y., Fong, K.W., Huen, M.S.Y., Li, L. and Chen, J. (2012) Fanconi anemia (FA) binding protein FAAP20 stabilizes FA complementation group A (FANCA) and participates in interstrand cross-link repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
46. Cicia, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A.R., Laghmani, E.H., Joenje, H., McDonald, N., de Winter, J.P., et al. (2007) Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol. Cell*, **25**, 331–43.
47. Ling, C., Ishiai, M., Ali, A.M., Medhurst, A.L., Neveling, K., Kalb, R., Yan, Z., Xue, Y., Oostra, A.B., Auerbach, A.D., et al. (2007) FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J.*, **26**, 2104–14.
48. Collis, S.J., Barber, L.J., Ward, J.D., Martin, J.S. and Boulton, S.J. (2006) *C. elegans* FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1398–1406.

49. Lee, K.Y., Yang, I., Park, J.E., Baek, O.R., Chung, K.Y. and Koo, H.S. (2007) Developmental stage- and DNA damage-specific functions of *C. elegans* FANCD2. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **352**, 479–485.
50. Fontebasso, Y., Etheridge, T.J., Oliver, A.W., Murray, J.M. and Carr, A.M. (2013) The conserved Fanconi anemia nuclease Fan1 and the SUMO E3 ligase Pli1 act in two novel Pso2-independent pathways of DNA interstrand crosslink repair in yeast. *DNA Repair (Amst)*, 10.1016/j.dnarep.2013.10.003.
51. Kratz, K., Schöpf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavó, E., Sartori, A. a, Hengartner, M.O. and Jiricny, J. (2010) Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*, **142**, 77–88.
52. Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., Kunkel, T. a, Harper, J.W., Colaiácovo, M.P., et al. (2010) A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol. Cell*, **39**, 36–47.
53. MacKay, C., Déclais, A.-C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T., et al. (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*, **142**, 65–76.

54. Klovstad, M., Abdu, U. and Schüpbach, T. (2008) *Drosophila brca2* is required for mitotic and meiotic DNA repair and efficient activation of the meiotic recombination checkpoint. *PLoS Genet.*, **4**, e31.
55. Martin, J.S., Winkelmann, N., Petalcorin, M.I.R., McIlwraith, M.J. and Boulton, S.J. (2005) RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3127–39.
56. Knoll, A. and Puchta, H. (2011) The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *J. Exp. Bot.*, **62**, 1565–79.
57. Youds, J.L., Barber, L.J., Ward, J.D., Collis, S.J., O’Neil, N.J., Boulton, S.J. and Rose, A.M. (2008) DOG-1 is the *Caenorhabditis elegans* BRIP1/FANCI homologue and functions in interstrand cross-link repair. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 1470–9.
58. Bleuyard, J.-Y., Gallego, M.E., Savigny, F. and White, C.I. (2005) Differing requirements for the *Arabidopsis* Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant J.*, **41**, 533–45.
59. Abdu, U., González-Reyes, A., Ghabrial, A. and Schüpbach, T. (2003) The *Drosophila* spn-D gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics*, **165**, 197–204.
60. Ward, J.D., Barber, L.J., Petalcorin, M.I., Yanowitz, J. and Boulton, S.J. (2007) Replication blocking lesions present a unique substrate for homologous recombination. *EMBO J.*, **26**, 3384–96.

61. Kang, M.H. (2011) Cancel all Hollidays for SLX4 mutations: identification of a new Fanconi anemia subtype, FANCP. *Clin. Genet.*, **80**, 28–30.
62. Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S. and Brill, S.J. (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**, 103–118.
63. Coulon, S., Gaillard, P.-H.L., Chahwan, C., McDonald, W.H., Yates, J.R. and Russell, P. (2004) Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 71–80.
64. Andersen, S.L., Bergstralh, D.T., Kohl, K.P., LaRocque, J.R., Moore, C.B. and Sekelsky, J.J. (2009) *Drosophila* MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Mol. Cell*, **35**, 128–135.
65. Majumder, S., Kramer, B., Sekelsky, J.J., Carolina, N. and Hill, C. (2002) *Drosophila* MUS312 Interacts with the Short Article MEI-9 to Generate Meiotic Crossovers. *Mol. Cell*, **10**, 1503–1509.
66. Saito, T.T., Youds, J.L., Boulton, S.J. and Colaiácovo, M.P. (2009) *Caenorhabditis elegans* HIM-18/SLX-4 interacts with SLX-1 and XPF-1 and maintains genomic integrity in the germline by processing recombination intermediates. *PLoS Genet.*, **5**, e1000735.
67. Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J.P., Minguillón, J., Ramírez, M.J., Pujol, R., et al. (2013) Mutations in ERCC4, Encoding the

DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia. *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 800–806.

68. Dubest, S., Gallego, M.E. and White, C.I. (2002) Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep.*, **3**, 1049–54.

69. Schiestl, R.H. and Prakash, S. (1988) RAD1, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae* is also involved in recombination. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3619–3626.

70. Basmacioglu, C.N., Subramani, S., Clegg, M., Nasim, A., Carr, A.M., Schmidt, H., Kirchhoff, S., Muriel, W.J., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J., et al. (1994) The rad16 Gene of *Schizosaccharomyces pombe* : a Homolog of the RAD1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2029–2040.

Table S1. *MHF2* alleles found in the *zmm* suppressor screens.

Alleles		Genomic position of the mutation	Change in DNA sequence	Change in protein sequence
<i>zip4(s)2</i>	<i>mhf2-1</i>	Chr2 : 29,624,529	C > T	Affects splicing acceptor site of exon 3
<i>hei10(s)174</i>	<i>mhf2-2</i>	Chr2 : 29,623,950	G > A	Q > STOP - deletion of the 5 last amino acids
<i>hei10(s)170</i>	<i>mhf2-3</i>	Chr2 : 29,624,034	C > T	Affects splicing acceptor site of exon 8

Table S2. Analysis of recombination using FTL tetrads.

Table A shows in each genotype the number of tetrads of each class observed according to the classification of Berchowitz and Copenhaver (19). The data have been obtained from sister plants, and the wild type and *fancm* figures have been pooled with the corresponding data (which were not significantly different from their respective genotypes) from (6) to increase statistical power. Table B shows genetic distance \pm S.D (standard deviation) in the two adjacent intervals calculated according to Perkins equation (34). Table C shows Interference between the intervals is estimated by the interference ratio (19, 22).

A

I2a I2b	Total	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Wild type	4481	3831	395	242	6	1	1	1	3	1	0	0	0
<i>mhf2-1</i>	1847	1441	268	115	2	3	6	8	3	0	0	1	0
<i>mhf2-2</i>	1092	856	140	82	1	1	4	3	3	1	1	0	0
<i>fancm-1</i>	1556	932	364	186	17	10	15	10	14	4	3	1	0
<i>fancm-1 mhf2-2</i>	1226	766	268	129	9	10	11	11	14	3	4	1	0

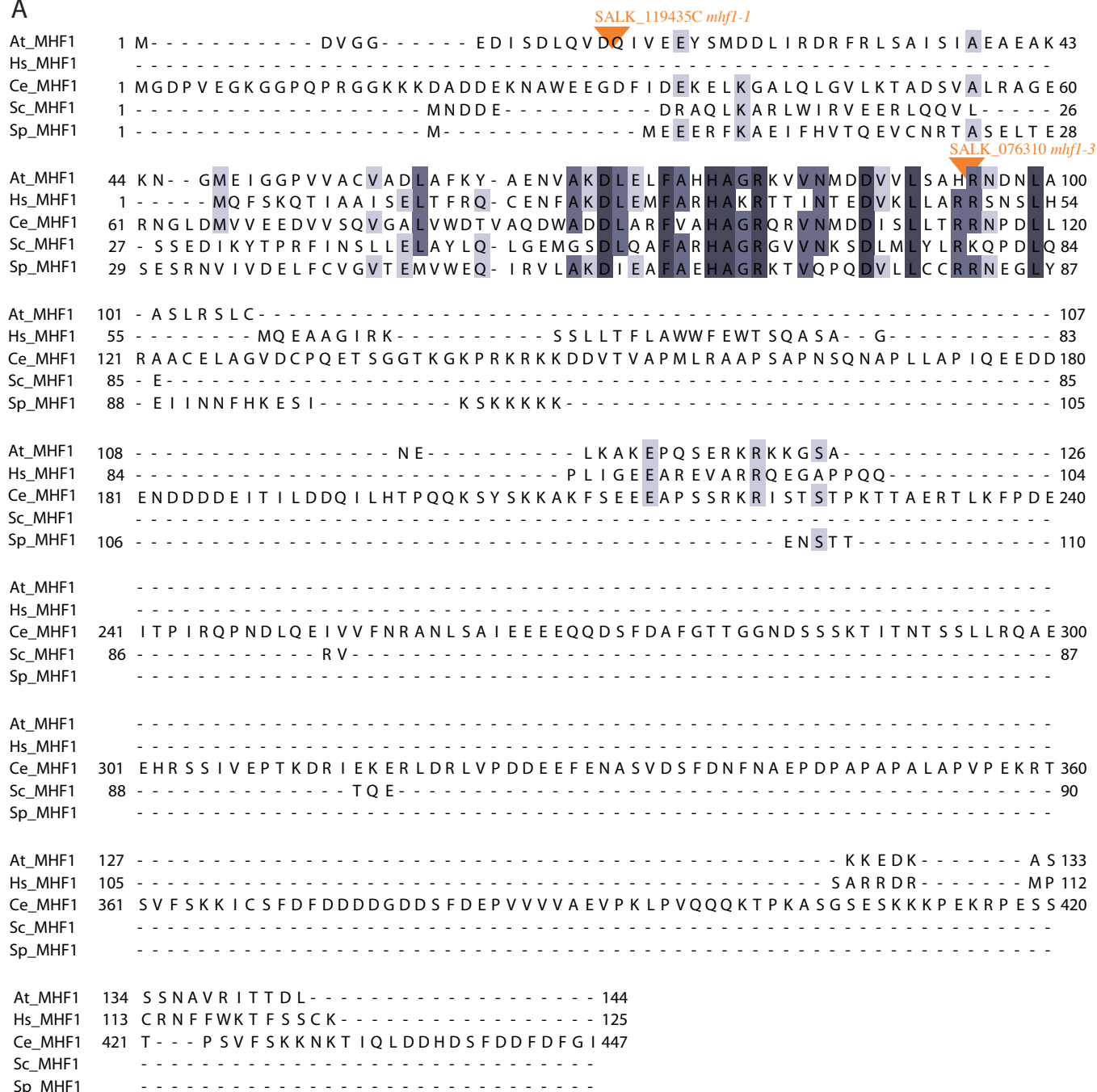
B

	I2a		I2b	
	cM	SD	cM	SD
Wild type	2.87	0.18	4.71	0.24
<i>mhf2-1</i>	3.79	0.34	8.28	0.50
<i>mhf2-2</i>	4.49	0.50	7.92	0.75
<i>fancm-1</i>	8.71	0.62	16.68	0.94
<i>fancm-1 mhf2-2</i>	8.08	0.69	17.05	1.16

C

	Wild type	<i>mhf2-1</i>	<i>mhf2-2</i>	<i>fancm-1</i>	<i>fancm-1 mhf2-2</i>
d(I2b) without CO in I2a	4.68	8.35	7.91	17.10	16.79
d(I2b) with CO in I2a	2.40	7.41	8.06	14.43	18.54
Interference ratio	0.51	0.89	1.02	0.84	1.10
p (IR=1)	1.18x10 ⁻⁶	0.56	0.97	0.31	0.64
p(IR=IR ^{WT})	-	0.21	0.16	0.01	4.15x10 ⁻³

A



B

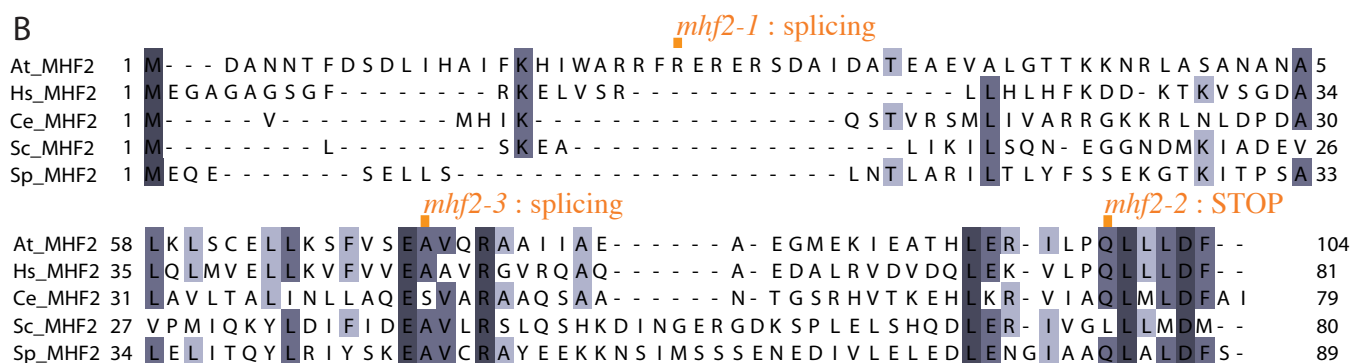


Figure S1. MHF1 and MHF2 protein alignments.

T-coffee protein alignment of MHF1 and MHF2 representative proteins. Position of MHF1 and MHF2 mutations studied here are indicated. Shading indicates 50% (light grey), 80% (medium grey) and 100% (dark grey) identity. *Hs*: *Homo sapiens*, *Ce*: *Caenorabditis elegans*, *Sp*: *Schizosaccharomyces pombe*, *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, *At*: *Arabidopsis thaliana*.

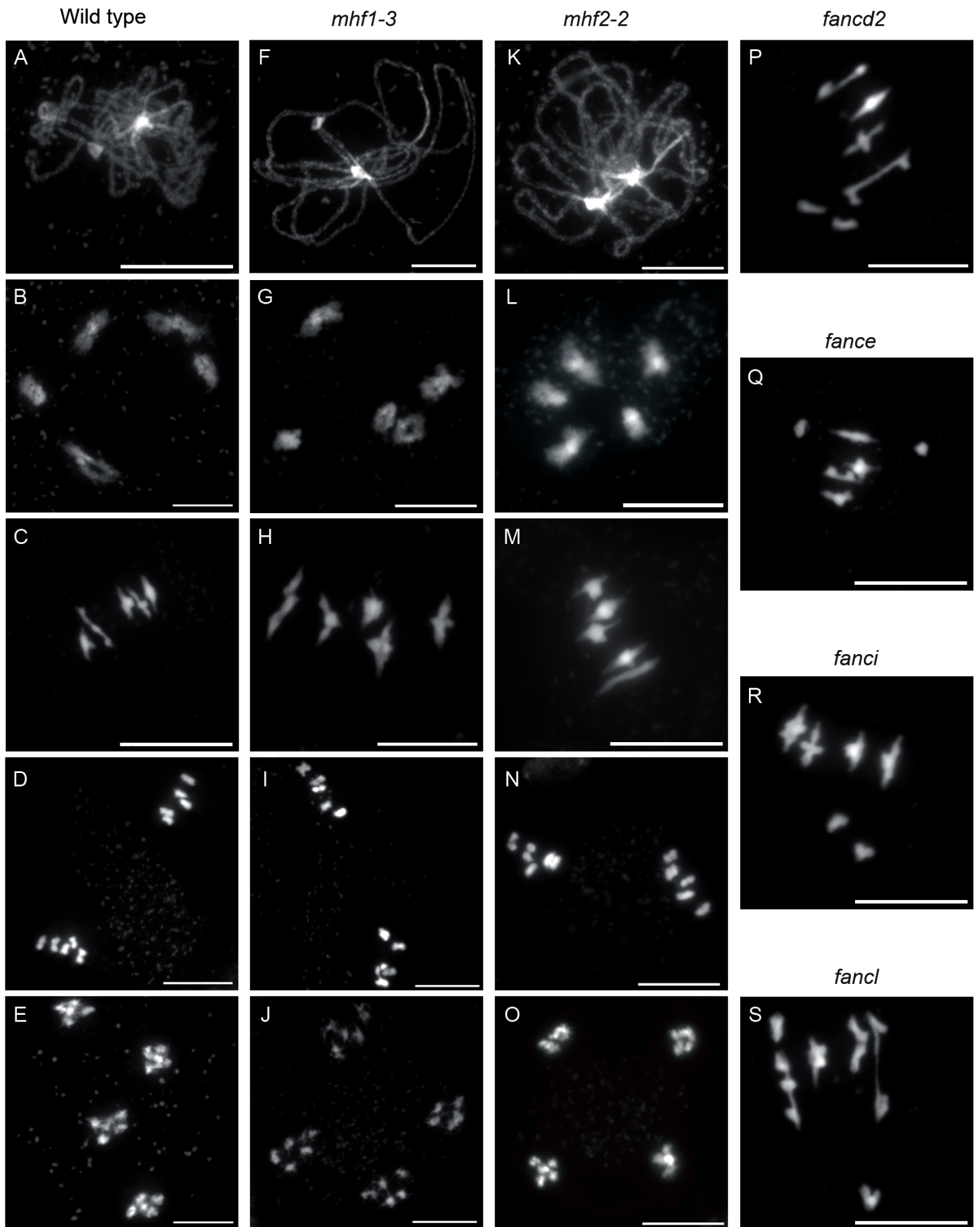


Figure S2. Male meiotic chromosome spreads in *mhfl-3 mhfl-2-1*, *fancd2*, *fance*, *fanci*, and *fancI*.

(A-E) Wild type. (F-J) *mhfl-3*. (K,O) *mhfl-2-1*. (P) *fancd2*. (Q) *fance*. (R) *fanci*. (S) *fancI*. (A, F, K) Pachytene. (B, G, L) diakinesis. (C, H, L, P, Q, R, S) Metaphase I. (D, I, N) Metaphase II. (E, J, O) Telophase II. Scale bar = 10 μ m.

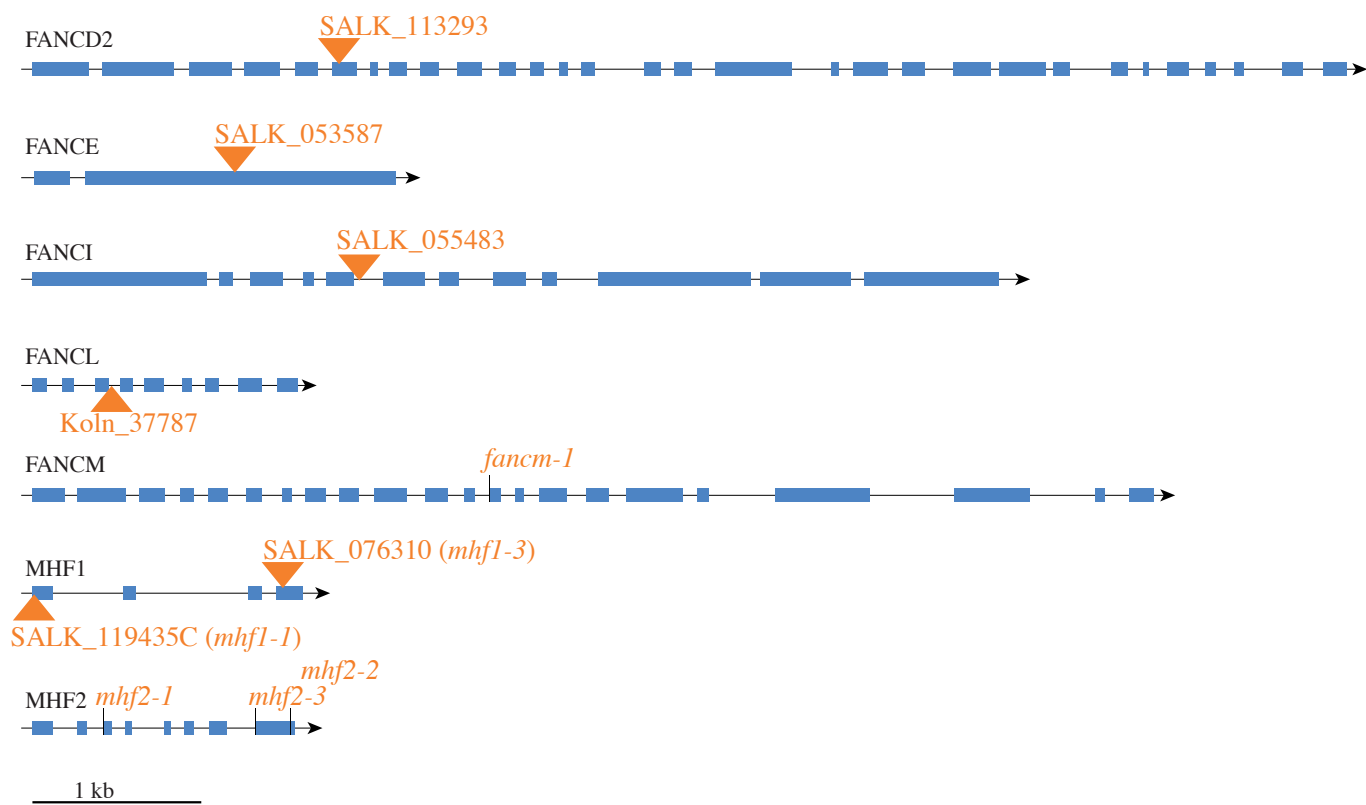


Figure S3. Structure of genes and position of mutations studied.

Exons are indicated as blue rectangles. Point mutations are indicated by vertical lines and T-DNA insertions are indicated with orange triangles.

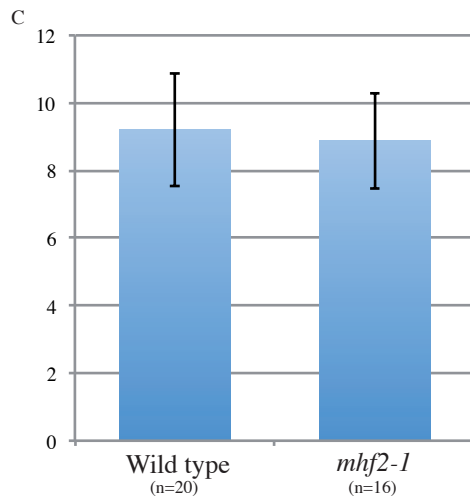
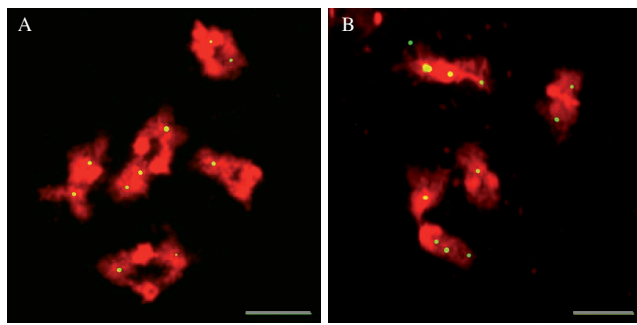


Figure S4. MLH1 immunolocalization.

Chromosome spreads of male meiocytes in (A) wild type and (B) *mhf2-1*. DNA stained by DAPI appears in red and MLH1 immuno-localization in green. Scale bar=5μm. (C) Quantification of MLH1 foci per cell.

FIGL1 limite la formation des crossovers

3.1 Introduction et Résumé

Les cribles supprimeurs ont aussi permis de révéler que la mutation du gène *FIDGETIN-Like-1* (*FIGL1*) est une protéine anti-crossover chez *Arabidopsis thaliana*.

Nous avons pu montrer que la mutation de *FIGL1* supprime le défaut de bivalents chez tous les *zmm* testés, et le simple mutant *figl1* présente une augmentation de 75% de la fréquence de CO sur six intervalles du génome d'*Arabidopsis*, faisant de FIGL1 une *bona fide* protéine anti-CO chez le sauvage.

FIGL1 limite la voie II de formation des CO : les extra-CO présents dans le mutant *figl1* ne sont pas marqués par MLH1 et l'interférence n'est plus détectable. De plus, le double mutant *figl1 mus81* montre de la fragmentation chromosomique en anaphase I, révélant que MUS81 est indispensable à la réparation des cassures en fond mutant. Ces caractéristiques sont similaires à celles des extra-CO présents chez le mutant *fancm*, mais nous avons pu montrer que FIGL1 et FANCM agissent dans deux voies de régulation différentes : le double mutant *figl1 fancm* présente 6 fois plus de crossovers que le sauvage, soit deux fois plus que dans le simple *fancm*. Cet effet cumulatif des deux mutations implique que FIGL1 et FANCM régulent deux étapes différentes de la recombinaison homologue méiotique. Les mutations *figl1* et *fancm* alimentent donc toutes les deux la voie II de formation de CO mais par des mécanismes différents.

Pour vérifier l'effet anti-CO de ces mutations à l'échelle du génome, nous avons réalisé les cartes génétiques des cinq chromosomes d'*Arabidopsis* dans les différents fond génétiques mutants. Ces données sont encore préliminaires (analyse de 50 plantes par génotypes seulement). Les cartes du mutant *figl1* confirment le rôle anti-CO de FIGL1 sur l'ensemble du génome. L'augmentation moyenne de la fréquence de CO est de 26% comparée au sauvage, avec de grandes variations le long des chromosomes. Nos données préliminaires ne permettent pas de détecter d'augmentation significative de la taille génétique chez *fancm* comparé au sauvage. Des données d'analyse de tétrades en fond Columbia-

Landsberg permettent tout de fois de dire que, sur certains intervalles au moins, *fancm* est capable d'augmenter la fréquence de CO significativement par rapport au sauvage en fond hybride. Nous présentons des arguments pour montrer que FANCM est une barrière très efficace à la formation des CO en fond pur (Columbia, Landsberg et Wassileskija), mais moins en fond hybride (Columbia-Landsberg ou Columbia-Wassileskija). La carte génétique du double mutant *figl1 fancm* montre une augmentation significative de la taille génétique par rapport au sauvage (2.5 fois), significativement plus importante que celles des deux simples mutants. Ce résultat confirme l'effet cumulatif des deux mutations et que FANCM et FIGL1 limitent la formation des crossovers aussi bien en fond pur qu'en fond hybride.

Nous montrons aussi que FIGL1 pourrait agir très précocement dans la voie de formation des CO, au moment de l'invasion simple brin (SEI, voir Introduction 2.2). La recombinaison homologue procède à la réparation des cassures double-brin en utilisant une séquence homologue comme matrice modèle. La chromatide sœur ou l'une des chromatides du chromosome homologue peuvent être choisies comme matrice de réparation. En mitose, la chromatide sœur est préférentiellement choisie, mais en méiose, des échanges avec le chromosome homologue permettent de former les crossovers. On parle de biais vers l'homologue. La protéine DMC1 et ses cofacteurs, dont la cycline SDS, sont essentiels à ce biais vers l'homologue. Les protéines des axes du complexe synaptonémal, et en particulier ASY1, l'homologue de HOP1 chez *Arabidopsis*, sont aussi nécessaires au biais. Nous avons pu montrer que FIGL1 et SDS jouent des rôles antagonistes sur DMC1, SDS jouant sur son chargement ou sa stabilisation tandis que FIGL1 pourrait dissocier DMC1 de la chromatine en absence de SDS. Dans un contexte où les axes latéraux du SC ne sont pas correctement assemblés et où le biais est altéré (*asy1*), FIGL1 devient nécessaire à la réparation des cassures. Nous proposons donc que FIGL1 soit capable de restreindre le nombre d'invasions sur l'homologue, et que les extra-CO du mutant *figl1* proviennent d'un surplus d'intermédiaires choisissant l'homologue comme matrice de réparation, aux dépends de la chromatide sœur.

FIGL1 est une AAA-ATPase, une famille de mécano-enzymes capables de déplier des macromolécules (voir Introduction 5). Nous proposons un modèle dans lequel FIGL1 pourrait être capable de dissocier le filament présynaptique en perturbant l'assemblage de DMC1 et/ou de RAD51, et de limiter les invasions sur le chromosome homologue et ainsi le nombre de crossovers.

3.2 Article 3 : Meiotic non-interfering crossovers are limited at two different steps : one depends on FIDGETIN-LIKE 1, the other on FANCM

Meiotic non-interfering crossovers are limited at two different steps:

one depends on FIDGETIN-LIKE 1, the other on FANCM

Chloe Girard^{1,2}, Liudmila Chelysheva^{1,2}, Sandrine Choinard^{1,2}, Nicole Froger^{1,2}, Nicolas Macaisne^{1,2}, Afef Lehemdi^{1,2}, Julien Mazel^{1,2}, Aurélie Chambon^{1,2}, Mathilde Grelon^{1,2}, Wayne Crismani^{1,2,3}, Raphael Mercier^{1,2}

¹INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, RD10, 78000 Versailles, France, ²AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, RD10, 78000 Versailles, France and ³ Current address: DuPont-Pioneer, 8305 NW 62nd Avenue, PO Box 7060, Johnston, IA 50131, USA.

To whom correspondence should be addressed :

raphael.mercier@versailles.inra.fr, wayne.crismani@pioneer.com

ABSTRACT

Meiotic crossovers (COs) generate genetic diversity and are critical for the correct completion of meiosis in most species. Their occurrence is tightly constrained but mechanisms underlying this limitation remain poorly understood. Here we show that *Arabidopsis* FIDGETIN-LIKE-1 (FIGL1) is a negative regulator of CO formation: *figl1* mutation is able to restore CO in *zmm* mutants, which are defective in interfering CO formation, and provokes a global increase of recombination genome wide compared to wild type. Similarly to what was shown in the *fancm* mutant, the extra-COs in *figl1* arise from the non-interfering pathway of CO formation, which is minor in wild type. However, the effect of *figl1* and *fancm* mutations on recombination are cumulative, leading to a six fold increase, without impairing chromosome segregation. This shows that FIGL1 and FANCM act independently. This additive effect was confirmed genome wide, however in F1 hybrids the effect of mutating *FANCM* was less pronounced than in inbred lines. Further, our data support that FIGL1 act at an earlier step in the recombination pathway than FANCM. Thus, FIGL1 and FANCM act at two distinct steps, both to prevent the occurrence of non-interfering CO.

INTRODUCTION

Meiotic crossovers (COs) shuffle parental alleles, introducing genetic variety on which selection can act. COs also provide a physical link between homologous chromosomes which is crucial for the proper segregation of chromosomes at meiosis I in most species (Zickler and Kleckner, 1999). Despite an excess of recombination precursors, most species only form close to the one, obligatory, CO per chromosome. Mechanisms

underlying this limitation are currently being unravelled, but still very few anti-CO proteins are known (Crismani et al., 2012; Lorenz et al., 2012; De Muyt et al., 2012; Youds et al., 2010).

At meiosis, double-strand breaks (DSBs) are formed by SPO11. These DSBs are repaired through homologous recombination (HR) using either the homologous chromosome or the sister chromatid, and this leads to the formation of both crossovers and non-crossovers (NCO). A bias toward the homologous chromatids, at the expense of the sister chromatid, is enforced by the recombinase DMC1 and its co-factors, including RAD51 (Cloud et al., 2012; Lao and Hunter, 2010). In *Arabidopsis thaliana*, the cyclin SDS is essential for the DMC1-mediated bias (Azumi et al., 2002; De Muyt et al., 2009). The choice of the template for repair is crucial to form COs during meiosis, and the mechanisms ensuring the homologous bias are debated (Hong et al., 2013).

At least two pathways co-exist to produce COs in many species including *Arabidopsis thaliana* (Higgins et al., 2004; Mercier et al., 2005): the first depends on a group of proteins collectively referred as the ZMM proteins and the other depends on the MUS81 endonuclease. The ZMM pathway accounts for the formation of approximately 85% of CO in *Arabidopsis thaliana*, and these COs exhibit interference: they tend to be distributed non-independently along the chromosomes (Berchowitz and Copenhaver, 2010). The MUS81 pathway is a minor pathway of CO formation in *Arabidopsis*, and MUS81-dependent COs are not sensitive to interference (Berchowitz et al., 2007; Higgins et al., 2008a)

In this study, using a previously described genetic screen that identified FANCM and MHF1-MHF2 as anti-CO factors (Crismani et al., 2012; Girard et al., 2014), we identify FIDGETIN-Like-1 (FIGL1) as a new protein limiting CO formation in *Arabidopsis thaliana*. We show that FIGL1 limits MUS81-dependent COs: extra-COs in *figl1* mutants are not

marked by MLH1 (a marker of ZMM-dependent CO), and interference is greatly diminished. While these characteristics are reminiscent of the properties of *fancm* extra-COs, we show here that FANCM and FIGL1 act in two non-redundant pathways to limit meiotic crossovers: tetrad analysis showed that the effects of both mutations are cumulative, leading to a 6-fold increase of CO formation. Genome-wide CO analysis confirmed this additive effect. While FANCM likely dissolve D-loop intermediates to produce NCO (Crismani et al., 2012; Lorenz et al., 2012), we provide evidence suggesting that FIGL1 could act earlier than of FANCM, by regulating the invasion step of homologous recombination.

RESULTS

Identification of FIGL1: A suppressor of the zmm reduction of chiasmata

CO-deficient mutants (e.g. *zmm* mutants) of *Arabidopsis thaliana* display reduced fertility, noticeable by their reduction in fruit length. This is due to homologous chromosomes not segregating correctly at meiosis I and the ensuing formation of aneuploid gametes. We designed a genetic screen to identify anti-CO factors in *Arabidopsis*, as described previously (Crismani et al., 2012). Using fruit length as a proxy for the level of CO formation, we screened for suppressors of CO deficient mutants, based on the idea that mutation of ‘anti-CO’ genes would restore the level of CO formation and therefore the correct chromosome segregation and fertility of the plants. Mutants of the following genes were used as bait; the pro-CO factors, *ZMMs* (namely *zip4*, *shoc1*, *hei10*, *msh4* and *msh5*, Table S1) and the plant specific cyclin *SDS*, helper of DMC1 at the invasion step of homologous recombination (Azumi et al., 2002; De Muyt et al., 2009).

The *zip4* suppressor screen led to the isolation of three complementation groups. The study of the first two revealed FANCM and MHF1-MHF2 as anti-CO proteins that act in

the same pathway (Crismani et al., 2012; Girard et al., 2014). Here we focus on the third complementation group, that has two allelic suppressors, *zip4(s)4* and *zip4(s)5* (Table S1). Using mapping and whole genome sequencing, we identified a putative causal mutation in *zip4(s)5*, a deletion of one base pair in the gene *At3g27120*. This mutation was confirmed as being causal by the sequencing of *At3g27120* in the allelic suppressor *zip4(s)4*. Other *zmm* screens then led to the identification of 12 other allelic mutations (Figure 1 and Table S1). All mutations fall into the AAA-ATPase domain or the VPS4 domain. These two domains are essential for ATPase activity and hexamerization of AAA-ATPase enzymes, both of which are crucial for their role *in vivo* (Lupas and Martin, 2002; Vajjhala et al., 2006; Vale, 2000).

In wild type *Arabidopsis* meiosis, the five pairs of homologs always form five bivalents at metaphase I, whereas *zmm* mutants have few bivalents (on average 1.3 bivalent per meiosis). All alleles of *figl1* largely – but never entirely – restored bivalent formation in all *zmm* backgrounds tested to an average of 3.7 per meiosis (Figure 1B). No somatic defect was observed in *figl1* mutants.

Sequencing of the cDNA revealed a mis-annotation, as the two *in silico* predicted genes AT3G27120 and AT3G27130 correspond to one mRNA *in vivo* (Genbank accession KM055500) (Figure S1A). Reciprocal BLAST analysis showed that the protein encoded by this gene is the single representative of the AAA-ATPase FIDGETIN family in *Arabidopsis* (Figure 1A and Figure S1). The FIDGETIN protein family comprises three proteins in mammals (FIDGETIN, FIDGETIN-Like-1 and FIDGETIN-Like-2). Phylogenetic analysis showed that only FIDGETIN-Like-1 (FIGL1) is conserved in other branches of eukaryotes, including *Arabidopsis* (Figure S1). We therefore named this gene FIGL1. FIDGETIN-Like-1 is present in most eukaryotes clades; however, we could not detect any representative of the FIDGETIN family in fungi, with the exception of the early divergent Microsporidia genera

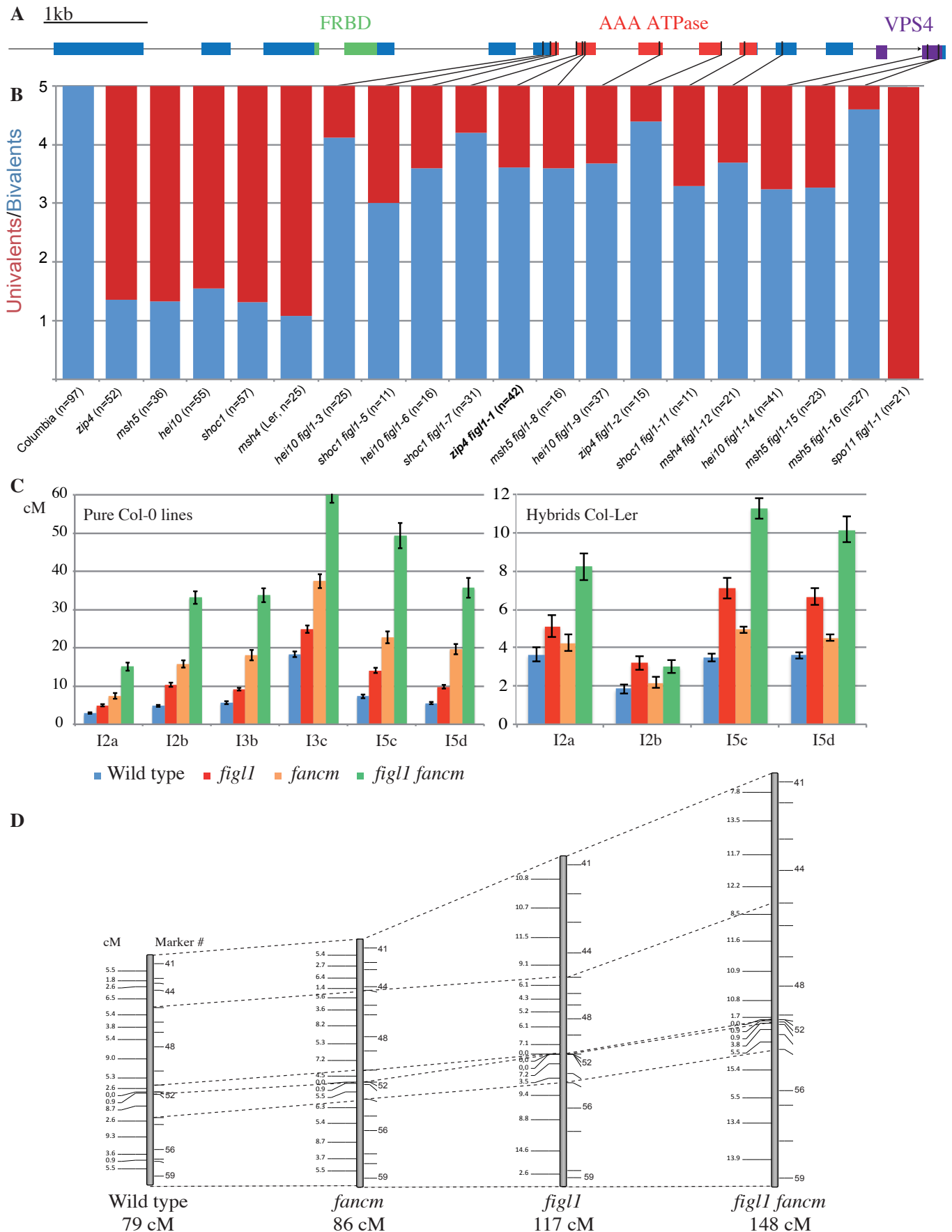


Figure 1: FIGL1 is an anti-CO protein that acts independently of FANCM.

A: FIGL1 is an AAA-ATPase. The conserved domains are indicated, see also Figure S1. Vertical black lines represent mutations found in the different screens (see also Table S1). **B:** All alleles of *fig1* have significantly more bivalents (in blue) than the *zmm* mutants, which show a majority of univalents (in red). **C:** Recombination (in cM) measured through tetrad analysis (Berchowitz and Copenhaver, 2008) in both pure Columbia-0 lines on six intervals across *Arabidopsis* genome (left) and in hybrid Columbia -Landsberg plants on 4 intervals (right). Raw data are available in Figure S3A. **D:** Genetic maps in Col/Ler hybrids of the chromosome 3 in the four genotypes (wild type, *fancm*, *fig1*, and the double mutant *fig1 fancm*).

that possesses a FIGL1, suggesting that this gene was lost early after the fungi lineage divergence.

No specific signal was detected using an antibody raised against N-terminal part of FIGL1. However, using over-expression of the protein in Tobacco leaves (transient expression), we were able to detect a strong signal restricted to the nucleus (Figure S2), indicating that FIGL1 may be a nuclear protein.

FIGL1 limits meiotic COs independently of FANCM

To test the effect of *FIGL1* mutation on CO frequency, we performed tetrad analysis (Berchowitz and Copenhaver, 2008). These data showed that: (i) the *figl1-1 zip4* double mutant had CO frequencies far greater than *zip4*, reflecting the cytological observations (Figure S3D); (ii) in the single mutant *figl1-1*, CO frequency is increased on average by 72% compared to wild type on the six intervals tested, leading to the conclusion that FIGL1 is a barrier to CO formation (Figure 1C); (iii) while single *fancm* mutants displays a three-fold increase in genetic distances, a six-fold increase is observed in the *figl1-1 fancm-1* double mutant compared to wild type, showing that the effect of each mutation is cumulative (Figure 1C and below). This result shows that FIGL1 and FANCM act by two distinct mechanisms to limit crossover formation at meiosis. The double mutant *figl1-1 fancm-1* plants are indistinguishable from wild type in terms of growth and fertility (57.5 ± 6 seeds per fruit in *figl1 fancm* (n=13) and 55.2 ± 6 in WT (n=24; T-Test $p=0.42$)). Meiosis proceeds normally in this double mutant (Figure S4) leading to the conclusion that having six times more crossovers per meiosis does not affect chromosome segregation.

Genetic maps of *figl1* reveal an overall global increase in CO formation

We sought to analyse the genome wide frequency and CO distribution in mutants for *FIGL1* and *FANCM*. We obtained mutant alleles in another genetic background by performing a suppressor screen with *msh4* in a Landsberg (Ler) background (Table S1). Tetrad analyses were performed on hybrid F1 Col/Ler plants and compared to the pure Col data. In addition, genetic maps were obtained through genotyping of the F2 plants obtained by self-fertilization (see Material and Methods). [Genetic data are preliminary, with approximately fifty plants analysed for each genotype. More data will be analysed in the final version of this manuscript].

In the hybrid *figl1* mutant, tetrad analysis showed an increase of recombination on the four intervals tested compared to hybrid wild type, with a 79% average increase (Figure 1C). This result is similar to the observed increase in inbred Col background (above). Genetic maps showed a global increase genome wide (Figure 1D and Figure S5, with a +26% of total map length (T-Test $p < 0.001$, see Material and Methods). The increase appears to be variable along chromosomes [more data are required to explore this question]. These genetic data, while preliminary, confirm that *FIGL1* is a barrier to CO formation.

Effect of *FANCM* mutations in inbreds and hybrids

The *msh4* screen in a Ler background also led to the identification of several *fancm* mutants, including *fancm-12* (Table S1). Fruit length in *fancm-12 msh4* (Ler) was as high as in *fancm-1 msh4* (Col) (Figure 2, [bivalent counting in progress]) confirming that *fancm* is a *bona fide* suppressor of *zmm* in both Columbia and Landsberg backgrounds. However, in the F1 plants between *fancm-12 msh4* (Ler) and *fancm-1 msh4* (in Col) (thus double *fancm*

msh4 mutant, hybrid Col/Ler), the increase in bivalent compared to *msh4* (Col/Ler), while significant ($p < 0.01$), was much lower than in either parental lines (T-Test, $p < 10^{-6}$). It thus appears that the *fancm* mutation is barely able to restore CO formation of *msh4* in the Col/Ler hybrid, while it does very efficiently in inbred Col and Ler. We then introgressed the *fancm-1* mutation in another background, Wassilewskija (Ws), through four consecutive backcrosses and marker-assisted selection. In Ws, *fancm-1* was able to efficiently restore bivalent formation of the *zip4* mutant (Figure 2). The *fancm-1 zip4* hybrid Col/Ws showed restored bivalent formation compared to *zip4*, but again much less efficiently than in the two parental lines. Our data and previous findings (Crismani et al., 2012) thus revealed that *FANCM* mutation is very efficient at suppressing *zmm* lack of COs in inbred lines (Columbia, Landsberg and Wassilewskija) but less efficient in hybrids (Col/Ler and Col/Ws). Measure of recombination by tetrad analysis recapitulated this conclusion with an average +200% increase when *fancm* is compared to wild type in Col (this study and (Crismani et al., 2012)) but only an average +22% increase in the F1 hybrids Col/Ler on the four intervals tested (Figure 1C). Moreover, genetic map distance of *fancm* in hybrids Col/Ler was 448cM, not statistically different from the 400cM of the hybrid wild type (T-Test, $p = 0.18$).

Finally, we performed additional marker segregation analysis using *fancm* in pure Columbia-0 using an additional mutant allele of *FANCM*. EMS-induced mutations from *fancm-2* (Crismani et al., 2012) were used as molecular markers to cover an arm of chromosome 1 and the centromere (Figure S6). Genetic distances in *fancm-1/fancm-2* increased significantly (on average, 117cM compared to 67cM in wild type, T-Test $p < 10^{-6}$). Of interest, the interval spanning the centromere, which has a low recombination frequency in wild type, remains similarly low in *fancm*. The increase (+74%, $p < 10^{-6}$) was greater than in the same region in the F1 hybrid (+26%, not significantly different from wild type, T-Test

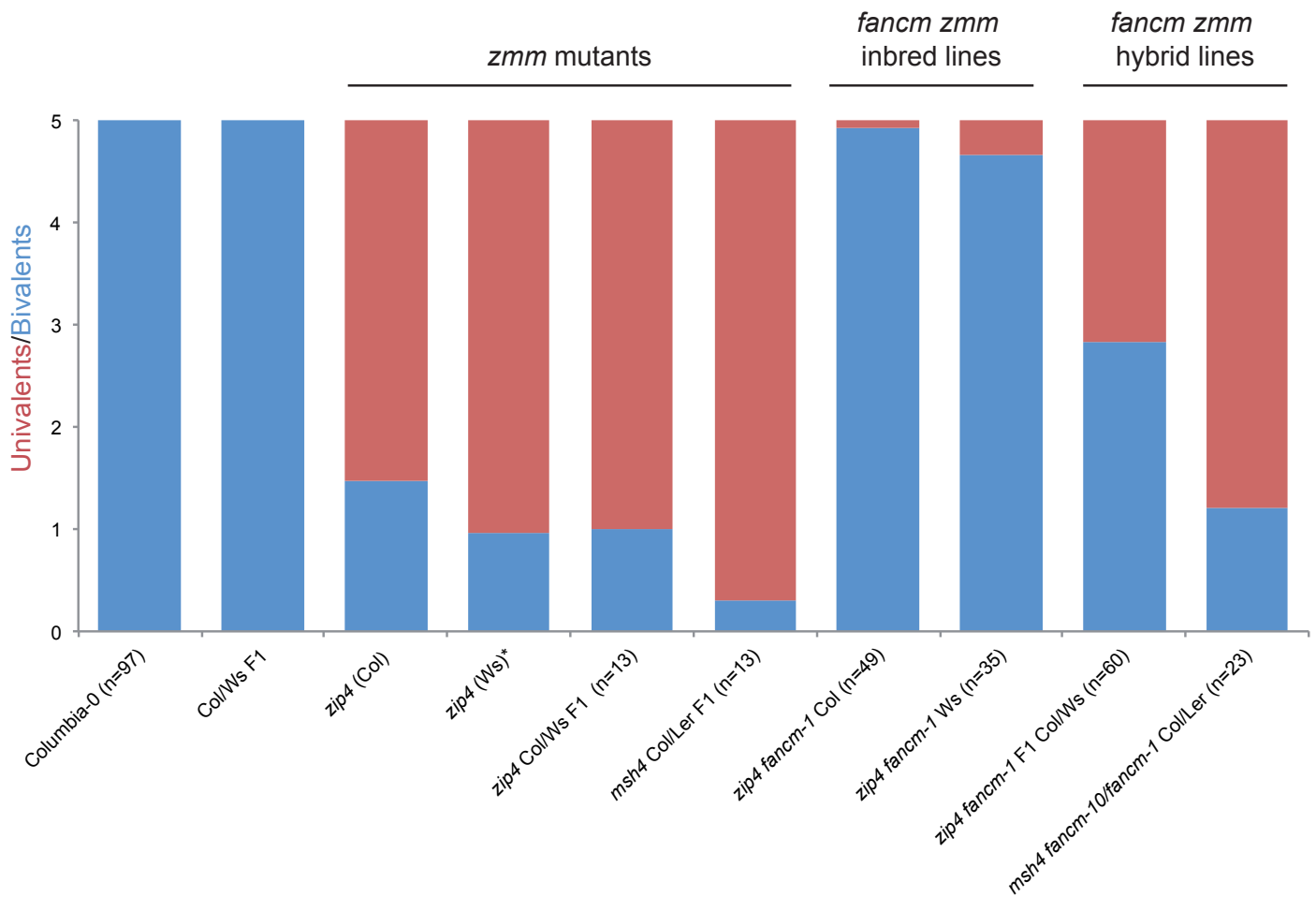


Figure 2 : *fancm* is an efficient anti-CO in inbreds but not in hybrids

Mutation in *FANCM* restores bivalent formation (in blue) in *zmm* backgrounds in inbreds, either Columbia (Col), Landsberg (Ler) or Wassilewskija (Ws), but not in hybrids (both Col/Ws and Col/Ler).

* Countings from Chelysheva *et al.*, 2007

[Countings for *msh4 fancm-12* in pure Ler are in progress]

$p=0.8$ [More data needed to test if there is any effect of *fancm* in hybrid]), further confirming that *fancm* has a greater effect in inbred than in hybrids.

The mutation of both *FANCM* and *FIGL1* in a Col/Ler context led to increase of recombination compared to wild type on the four interval intervals tested with tetrads analysis (Figure 1C), with an 2.5-fold increase on average. This is higher than in both single mutants, showing that *figl1* and *fancm* have a cumulative effect also in the hybrid context. However, this increase is lower than what was observed when comparing *figl1 fancm* and wild type in Col lines (6 fold). This is only due to *fancm* being less efficient in hybrid than in inbred. Indeed there is the same effect of mutating *figl1* in a *fancm* mutant either in hybrid or inbred (*figl1 fancm* vs *fancm*: 1.96 and 2.03 average ratio, respectively) whereas mutating *fancm* in *figl1* mutant is much less effective in hybrid than in inbred (*figl1 fancm* vs *figl1*: 1.42 and 3.45 average ratio, respectively). The total map length increased from 400cM in WT to 769cM in *figl1 fancm* (T-Test, $p<10^{-6}$), which is higher than both single mutants (448cM in *fancm* and 515cM in *figl1*, T-Test, $p<10^{-6}$). Altogether, these data showed that (i) *FIGL1* and *FANCM* mutations have cumulative effect in inbreds as in F1 hybrids; (ii) *FANCM* is a more efficient anti-CO protein in inbred than in hybrid contrary to *FIGL1* which is equally efficient in both contexts.

***figl1* limits MUS81-dependent crossover formation**

We then investigated the molecular origin of the *figl1* extra-CO. Mutating *SPO11* in *figl1* abolished bivalent formation (Figure 1B), showing that CO formation in *figl1* arises from *SPO11*-dependent double-strand breaks. Moreover, immuno-detection of *DMC1* showed that the level of DSB formation in *figl1* was not different from wild type, suggesting that the extra-CO in *figl1* do not arise from an excess of DSBs (Figure 3A). At least two

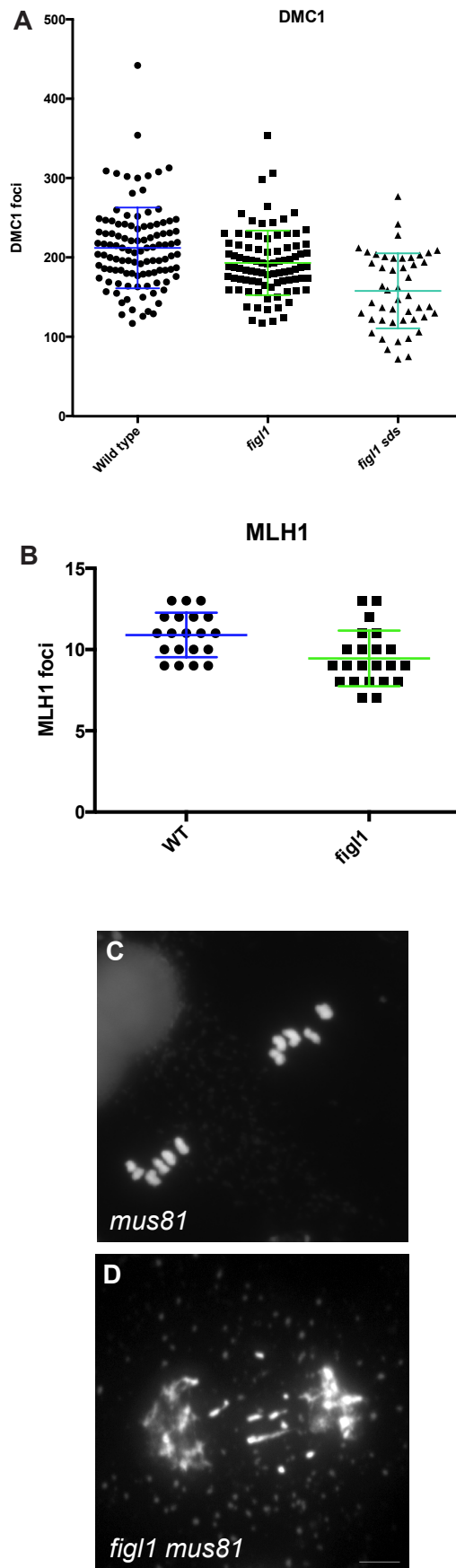


Figure 3: FIGL1 limits MUS81-dependent CO formation.

A: DMC1 foci count in wild type, *figl1-1* and *figl1-1 sds* shows no statistical difference. **B:** MLH1 foci number at diakinesis is not changed in *figl1-1* compared to wild type. **C-D:** Anaphase I in *mus81* (C) and *figl1 mus81* double mutant (D), the latter displays chromosome fragmentation indicative of unrepaired recombination intermediates.

classes of COs coexist in *Arabidopsis thaliana*: one dependent on ZMM proteins, marked by the proteins MLH1 and subject to interference; and one dependent on MUS81 which is insensitive to interference (Berchowitz et al., 2007; Chelysheva et al., 2010; Mercier et al., 2005). Immuno-labeling of MLH1 did not reveal any differences between *figl1* and wild type (Figure 3B) suggesting that the extra-COs observed in *figl1* are not class I crossovers. Corroborating this, the strength of interference was weaker in *figl1* mutant compared to WT on all intervals tested (Figure S3C), suggesting that extra-COs in *figl1* are not sensitive to interference. Moreover, in the *figl1 mus81* double mutant, chromosome fragmentation was observed (Figure 3D) showing that MUS81 becomes essential for the proper repair of recombination intermediates in *figl1*. We thus propose that FIGL1 limits MUS81 dependent CO formation, which normally accounts for only $\approx 15\%$ of COs in wild-type *Arabidopsis* (Berchowitz et al., 2007).

Synapsis in *figl1* was not different from wild type, as measured by immuno-localisation of the central element of the synaptonemal complex (SC), ZYP1. We also measured ZYP1-marked SC length in *fancm*, which was not different from wild-type ($125.6\mu\text{m}$ [n = 32] v $125.5\mu\text{m}$ [n = 33]). This shows that increasing the frequency of non-interfering COs does not affect the SC length. While SC length has been shown to be tied to genetic distances (discussed in (Drouaud et al., 2007)), it would seem that these fluctuations may be dependent only upon the ZMM COs.

FIGL1 could regulate the invasion step of homologous recombination at meiosis

In mitosis, COs tend to occur between sister chromatids; whereas at meiosis, COs tend to engage two chromatids from the two homologous chromosomes (Lao and Hunter, 2010). The widely conserved DMC1 and the plant-specific cyclin SDS are essential for the

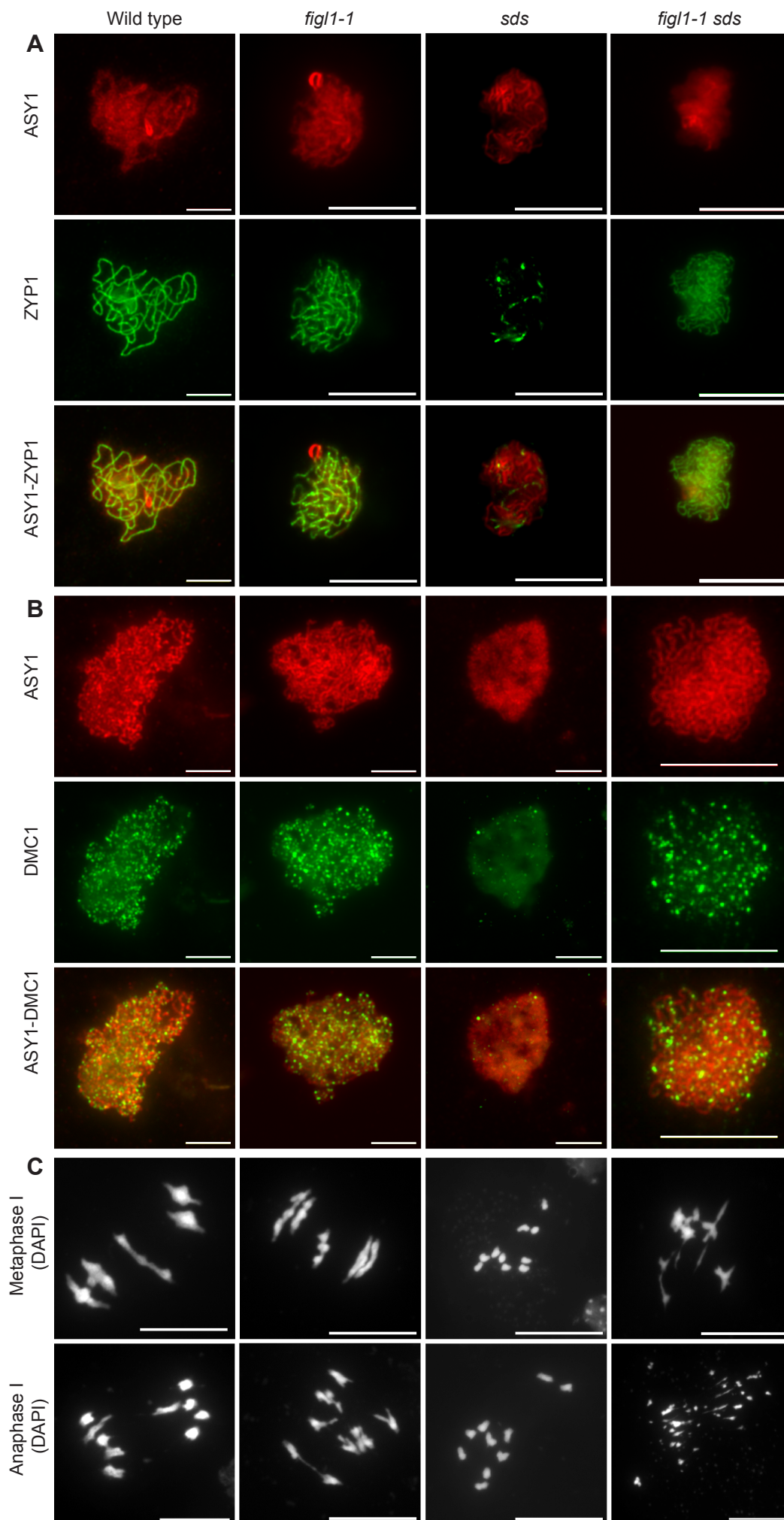


Figure 4 : FIGL1 genetically interacts with SDS

Synapsis (A), DMC1 foci (B) and bivalent formation (C) are seen in both wild type and *figl1* mutant but not in *sds*. All are restored in *figl1 sds* double mutant compared to *sds*. Chromosome fragmentation is revealed at anaphase I in *figl1 sds* but in no other genotypes (C).

repair of DSBs on the homologous chromosome in *Arabidopsis*, and favour the formation of COs at meiosis: synapsis is abolished in *dmc1* and *sds* mutants, no COs are formed (Figure 4 and Figure S7) and DSBs are repaired through the activity of RAD51, likely on the sister chromatid (Azumi et al., 2002; Couteau et al., 1999; De Muyt et al., 2009; Vignard et al., 2007). Although *fancm sds* display the same phenotype as *sds* (not shown), *figl1-1 sds* double mutant displayed a phenotype different from either single mutant. First, while synapsis was virtually abolished in *sds*, mutation of *figl1-1* in this background restored full synapsis, as revealed by chromosome spreads and the immuno-labelling of the ZYP1 protein (Figure 4A). The restoration of synapsis and bivalent formation suggests that SDS and FIGL1 may have antagonistic roles towards DMC1. To support this hypothesis, while DMC1 foci formation was abolished in *sds* (De Muyt et al., 2009), it was restored in *figl1-1 sds* (Figure 3B and Figure 4B).

At metaphase I, ~5 bivalent-like structures were observed in the double mutant *figl1 sds* whereas *sds* forms only univalents (Figure 3C and S7). Further, *figl1-1 sds* showed massive chromosome fragmentation at anaphase I (Figure 4D), demonstrating that: (i) SDS is essential for the repair on the homolog; (ii) in absence of SDS, FIGL1 is essential to repair DSBs; (iii) FIGL1 may suppress the repair of DSBs on the homologous chromosomes since its absence leads to the formation of extra COs.

Restoration of synapsis and bivalent formation in *figl1-1 sds* are dependent on both DMC1 and RAD51: *figl1-1 sds dmc1* and *figl1-1 sds rad51* showed neither synapsis nor bivalent formation (Figure S7). Of interest, *figl1-1 sds dmc1* did not show fragmentation either, implying that the fragmentation observed in *figl1 sds* was due to the presence of DMC1. However *figl1-1 sds rad51* showed major fragmentation like *rad51*. This argues for an inhibition of RAD51 by DMC1 to repair DSBs, as observed previously, in *Arabidopsis*

thaliana and in yeast (Cloud et al., 2012; Uanschou et al., 2013). All these data point towards a role for FIGL1 at the invasion step of meiotic homologous recombination to limit the formation of crossovers.

To support to this hypothesis, the double mutant *figl1 asy1* displayed fragmentation at anaphase I (Figure S8). ASY1 is the homolog of HOP1 in *Arabidopsis*, and *asy1* mutants present an absence of synapsis and very few bivalents at metaphase I, indicative of defective bias DSB repair towards the homolog (De Muyt et al., 2009; Sanchez-Moran et al., 2008). The fact that in an *asy1* background, further mutation of *FIGL1* induces chromosome fragmentation indicates that in absence of ASY1, FIGL1 is essential for the correct repair of DSBs, most likely on the sister.

DISCUSSION

FIGL1 is a new anti-CO factor limiting MUS81-dependent COs

Despite the fact that COs are essential to ensure the faithful segregation of homologous chromosomes at meiosis I in most species, CO formation is constrained. Factors promoting CO formation are well known, but mechanisms that limit it at meiosis are only starting to be deciphered. Here we identified FIGL1 as a meiotic anti-CO factor. FIGL1 limits the class-II pathway of CO formation, dependent on MUS81. This characteristic is reminiscent of that of FANCM (Crismani et al., 2012), but we showed here that FIGL1 and FANCM act at two different steps of DSB repair that prevent CO formation. It therefore seems that *FIGL1* and *FANCM* mutations fuel the same pathway of CO formation by two distinct mechanisms. Genome wide genetic maps confirmed that mutating both *FIGL1* and

FANCM leads to a cumulative increase of CO frequency, thus establishing that FIGL1 and FANCM limit CO formation at two different steps in hybrids as in inbreds.

However, *fancm* effect on CO frequency was greatly reduced in Col/Ler hybrids compared to inbred Columbia lines, with a +200% increase in Col but only +22% in Col/Ler. This drastic reduction is specific to *fancm*, as *figl1* effect on recombination is not affected by the hybrid status (+72% in Col and +79% in Col/Ler). We currently cannot explain this phenomenon. One could imagine that the sequence divergence between Columbia-0 and Landsberg could affect the efficiency of FANCM as an anti-CO protein. DSB repair proceeds to the invasion of a homologous sequence that leads to the formation of the D-loop intermediate. It was proposed that FANCM could disrupt these D-loops to prevent CO formation (Crismani et al., 2012; Lorenz et al., 2012). The invasion step could be affected by the heterology between Col and Ler sequences, leading to less D-loop formed upon which FANCM could act. However, the fact that D-loop are thought to be only few base pairs long (Drouaud et al., 2013) and that polymorphism ratio between Col and Ler is only 1 SNP every ~250-300pb (Nordborg et al., 2005) do not support this hypothesis. There may therefore be additional sequence- or not sequence-base mechanisms that impair the anti-CO activity of FANCM in hybrids.

We present here evidence that support a role for FIGL1 early in the process of CO formation, different from FANCM's D-loop dissociation proposed activity. Notably, FIGL1 and SDS have antagonizing roles toward DMC1; DMC1 loading and maintenance on the nucleoproteic filament requires SDS, while its removal is promoted by FIGL1 in the *sds* background. We thus propose that FIGL1 could act at the invasion step of homologous recombination to destabilize, directly or indirectly, DMC1 presynaptic filament (see below).

FIGL1 is a conserved AAA-ATPase

FIGL1 is an AAA-ATPase (Beyer, 1997; Frickey and Lupas, 2004), a family of unfoldase proteins (Vale, 2000) involved in the disruption of protein polymers as different as microtubules or chromosome axis components (Chen et al., 2014; McNally and Vale, 1993). All mutations identified in the screen fall into the two conserved domains: the AAA-ATPase domain and the VPS4 domain. This indicates that ATPase activity and oligomerization of FIGL1 are important for its anti-CO activity (Lupas and Martin, 2002; Vajjhala et al., 2006; Vale, 2000). FIGL1 is the only member of the Fidgetin sub-family to be widely conserved (Figure S1C), contrary to FIDG and FIGL2.

Human FIGNL1, the homologue of *Arabidopsis* FIGL1, as well as FIGL1 from *C.elegans* have been showed to form an hexameric ring oligomer, which is the classical conformation for AAA-ATPases (Chen et al., 2014; Peng et al., 2013; Vale, 2000). Human FIGNL1 has been shown to interact with RAD51, and to co-localize with RAD51 in the nucleus of irradiated cells (Yuan and Chen, 2013). The FRBD domain (FIGNL1's RAD51 binding domain) is necessary for the interaction, and this domain is conserved in *Arabidopsis* (Figure S1B). FIGNL1 appears to be involved, alongside RAD51, in the repair of DSBs in irradiated cells (Yuan and Chen, 2013). This would implicate FIGNL1 in homologous recombination mechanisms in somatic cells. Also, mouse FIGNL1 was found as the best candidate for a QTL of reduced testis weight, and *FIGNL1* was shown to be expressed in meiocytes at pachytene (L'Hôte et al., 2011). This could indicate a putative role for FIGNL1 in meiosis in mouse. Altogether this may point toward a conserved function for FIGL1 in limiting meiotic CO formation.

FIGL1 mechanism to limit CO formation

At meiosis, DSBs are induced by SPO11 (Grelon et al., 2001; Keeney and Giroux, 1997), are then repaired by the homologous recombination (HR) machinery and lead to the formation of crossovers and non-crossovers (gene conversions). An early step of HR is the invasion of a homologous chromatid that will act as a template for repairing the break. The two recombinases DMC1 and RAD51 are loaded on DSBs early in prophase I (Chelysheva et al., 2007; Kurzbauer et al., 2012; Sanchez-Moran et al., 2008), and will favour the choice of the homologous chromosome as a template for repairing the DSB, at the expense of the sister chromatid (Lao and Hunter, 2010). DMC1 and RAD51 form a presynaptic filament that scans available templates for regions of homology (Danilowicz et al., 2014), and invades the homologous template (single-end invasion) that will lead to the formation of the D-loop (Hunter and Kleckner, 2001).

FIGL1 being an AAA-ATPase, an attractive model would be that FIGL1 could disrupt the presynaptic filament, hence inhibiting D-loop formation. In this model (Figure 5), FIGL1 would remove, directly or indirectly, DMC1 from the resected ends, allowing RAD51 to repair on the sister chromatid, but not on the homologous chromosome. In the absence of FIGL1, more DSBs would retain DMC1, leading to more invasion events on the homologous chromosome and more COs. This model mirrors PCH2 action on HOP1 (Chen et al., 2014). PCH2 is also an AAA-ATPase, from another sub-family than FIDGETIN proteins (Frickey and Lupas, 2004). It has been shown that PCH2, which also assembles as a ring shaped particle, is able to disrupt the axial element of the synaptonemal complex HOP1 from DNA (Chen et al., 2014). This correlates with studies in mouse showing the Hop1-like HORMAD1 and HORMAD2 proteins are depleted from chromosome axes by the actions of the PCH2

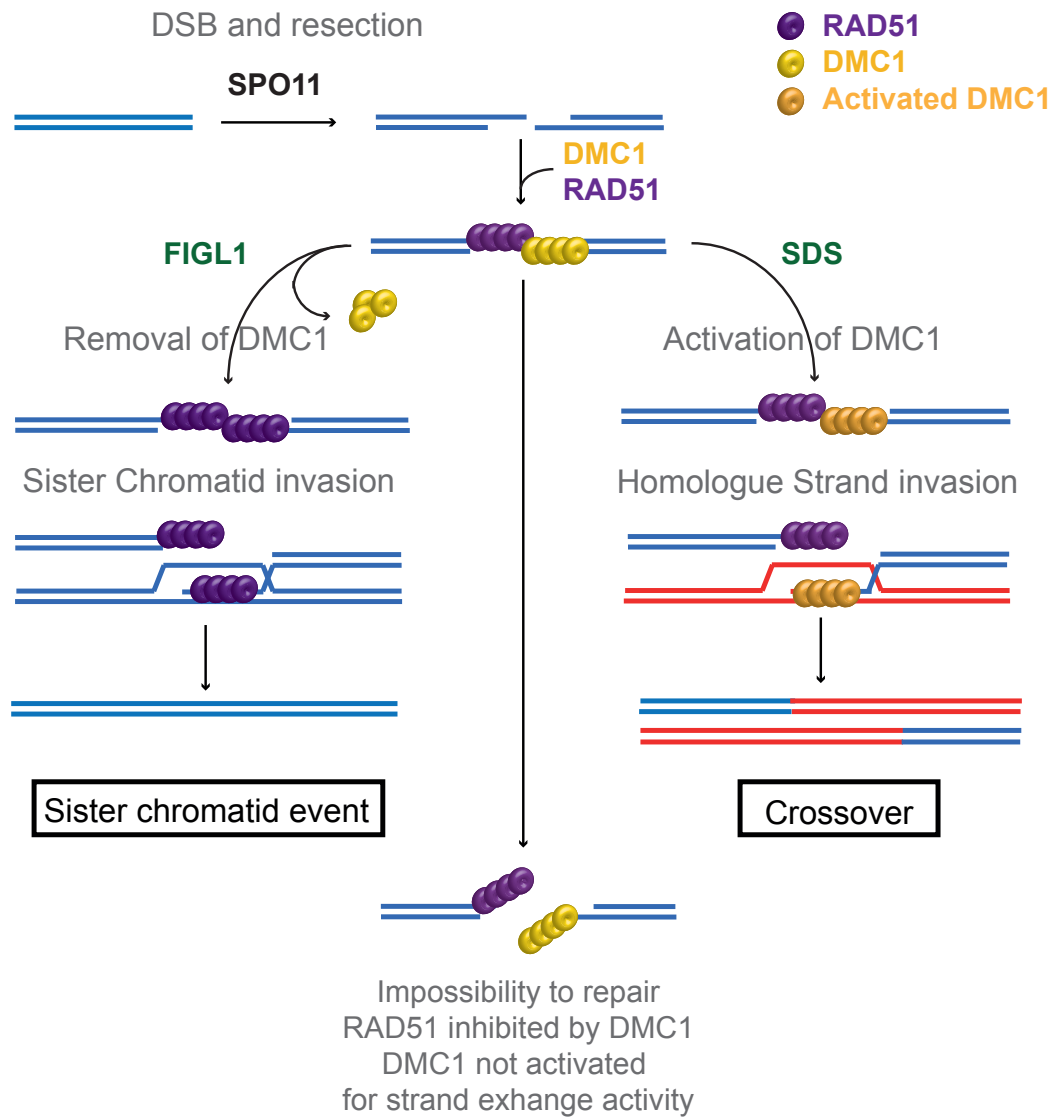


Figure 5 : Proposed model for the anti-CO activity of FIGL1

FIGL1 could mediate the removal of DMC1 from the presynaptic filament and would allow RAD51 to repair on the sister chromatid. FIGL1 action would therefore result in the promotion of sister chromatid events. SDS would be important to counteract FIGL1 effect and activate and/or stabilise DMC1. Stabilised DMC1, together with RAD51, would be able to promote crossover formation. In a *figl1* mutant, more CO would be formed due to more invasions on the homologous chromosome. In a *sds* mutant, FIGL1 would remove all DMC1 from the presynaptic filament. In the *figl1 sds* double mutant, DMC1 would not be removed nor activated, resulting in blocked intermediates which could not be repaired, leading to chromosome fragmentation.

ortholog Trip13 (Wojtasz et al., 2009). A PCH2 homologue is present in the *Arabidopsis* genome but has not been functionally characterized yet.

Our data support the proposed model. In an *sds* background, FIGL1 would be able to remove DMC1 from the DSB repair intermediates. SDS would hence be necessary to balance the action of FIGL1 in WT meiosis. We showed that *figl1 sds* displays chromosome fragmentation, which is suppressed by the further mutation of *DMC1*. This suggests that DMC1 could have an inhibiting role upon RAD51 for its strand exchange activity, as this has been shown previously, in *Arabidopsis* and *S. cerevisiae* (Cloud et al., 2012; Uanschou et al., 2013). In *sds*, DMC1 would not be activated for its strand exchange activity and would be removed by the action of FIGL1. However, in the double mutant *figl1 sds*, DMC1 would not be removed anymore, leading to intermediates with both DMC1 and RAD51 loaded. DMC1 would not be able to perform its strand exchange activity, due to the absence of SDS, and RAD51's own strand exchange activity would be inhibited by the presence of DMC1. These intermediates would be a dead-end for the HR, and would result in un-repaired DSBs, leading to the observed chromosome fragmentation.

We have identified a new anti-CO factor, FIGL1, whose mutation increases meiotic COs in wild-type *Arabidopsis* independently of the other known anti-CO factor FANCM. This work also revealed that increasing recombination up to six fold is not problematic for chromosome segregation at meiosis I. We provide evidence to support a model where FIGL1 could antagonize the homologous bias promoted by DMC1 and SDS, and therefore limit homologous invasion, D-loop formation and subsequent CO formation at meiosis.

Material and methods

Genetic resources

The lines used in this study were: *spo11-1-3* (N646172) (Stacey et al., 2006), *dmc1-3* (N871769) (Pradillo et al., 2011), *sds-2* (N806294) (De Muyt et al., 2009), *rad51-1* (Li et al., 2004), *zip4-1* (EJD21) (Chelysheva et al., 2007), *zip4-2* 52 (N568052) (Chelysheva et al., 2007), *shoc1-1* (N557589) (Macaisne et al., 2008), *msh5-2* (N526553) (Higgins et al., 2008b), *mus81-2* (N607515) (Berchowitz et al., 2007), *fancm-1* (Crismani et al., 2012), *hei10-2* (N514624) (Chelysheva et al., 2012). Tetrad analysis lines were: I2ab (FTL1506/FTL1524/FTL965/*qrt1-2*), I3bc (FTL1500/FTL3115/FTL1371/*qrt1-2*) and I5cd (FTL1143U/FTL1963U/FTL2450L/*qrt1-2*) from G.Copenhaver (Berchowitz and Copenhaver, 2008). *Atzip4(s)5* (*figl1-1*) was sequenced using Illumina technology. Mutations were identified through the MutDetect pipeline (Girard et al., 2014).

Cytology technics

Meiotic chromosome spreads have been performed as described previously (Ross et al., 1996). Immuno-localisations of MLH1 were performed as described in (Chelysheva et al., 2010), ASY1 and ZYP1 as in . Observations were made using a ZEISS AxioObserver microscope. Graphs of Figure 3 were made using the GraphPad software Prism6 (<http://www.graphpad.com>).

Cloning and transient expression in *N.benthamiana*

FIGL1 open reading frame was amplified with DNA primers bearing the AttB1 and AttB2 and cloned into Gateway vector pDONR207 using BP recombination (Invitrogen) producing the entry vector, which was then sequenced. Primers used for PCR amplification on Columbia DNA were : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTAAAGGAATGTGTGGGTCG and GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGGCTTAACTACCAAACTG. An LR reaction between the entry vector and the destination vectors pGWB5 and pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) produced the final expression vectors, where coding sequence of FIGL1 is cloned in fusion with a GFP protein, either in C-terminal or N-terminal of FIGL1 sequence. Each expression vector was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1(pMP90) by electroporation. *Agrobacterium* bacterial cultures were incubated overnight at 28°C with agitation. Each culture was pelleted, washed, and resuspended in infiltration buffer (13 g/L bourtouage N°2 medium [Duchefa Biochemie] and 40 g/L sucrose, pH 5.7) to an OD₆₀₀ of 0.5. The inoculum was delivered to the lamina tissue of *N. benthamiana* leaves by gentle pressure infiltration through the lower epidermis. To enhance transient expression of GFP and BiFC fusion proteins, the P19 viral suppressor of gene silencing was coexpressed (Voinnet et al., 2003). Observations were made with a Zeiss LSM 710 confocal microscope.

Phylogeny

Proteins from the FIDGETIN family were identified using literature search and reciprocal BLASTp and PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.arabidopsis.org/> and <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>). Alignments were made by T-COFFEE and subsequent tree building was realised by PhyML on www.phylogeny.fr. Tree rendering was

performed on Fig Tree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) and Adobe Illustrator. Accession numbers for the sequences are: Dm_FIGL1 CG3326 (Zhang et al., 2007), Hs_FIDG NP_060556.2 (Mukherjee et al., 2012), Hs_FIGL1 NP_001036227.1 (Yuan and Chen, 2013), Hs_FIGL2 NP_071399.2, Mm_FIDG AAG17289.1 (Cox et al., 2000), Mm_FIGL1 NP_001156832.1 (L'Hôte et al., 2011), Mm-FIGL2 NP_001201840.1 (YANG et al., 2005), Ce_FIGL1 NP_504197 (Yakushiji et al., 2004), Nb_FIGL1 EOB14776.1, Xl_FIGL1 : NP_001086763.1, Dr_FIDG NP_001018411.1, Dr_FIGL1 NP001122223.1, Oc_FIGL1 XP_001421485.1, Trb_FIGL1 XP_844861.1 (Casanova et al., 2009).

FTL analysis

Tetrad slides were prepared as in (Berchowitz and Copenhaver, 2008) and counting was performed through an automated detection of tetrads using a pipeline developed on the Metafer Slide Scanning Platform (<http://www.metasystems-international.com/metafer>). For each tetrad, attribution to a specific class (A to L) was double checked by hand (Berchowitz and Copenhaver, 2008). Genetic sizes of each interval was calculated using the Perkins equation (Perkins, 1949): $D = 100 \times (Tetratype\ frequency + 6 \times Non-Parental-Ditype\ frequency) / 2$ in cM. (see <http://www.molbio.uoregon.edu/~fstahl> for details)

Interference ratio was calculated as in (Berchowitz and Copenhaver, 2008). For two adjacent intervals I1 and I2, two populations of tetrads are considered: those with at least one CO in I2 and those without any CO in I2. The genetic size of I1 is then calculated for these two populations using the Perkins equation (above), namely D_1 (I1 with CO in I2) and D_2 (I1 without a CO in I2). The IR is thus defined as $IR = D_1 / D_2$. If the genetic size of I1 is lowered by the presence of a CO in I2, $IR < 1$ and interference is detected. If not, IR is close to

1 and no interference is detected. A khi-square test is performed to test the null hypothesis ($H_0: D_1=D_2$) (Figure S3C).

The coefficient of interference (CoC) was calculated as in (Shinohara et al., 2003). The CoC is defined in (Muller, 1916) and compares the observed frequency of double CO compared to the expected frequency of double CO without interference. The observed frequency is defined by $f_o(2CO)$ = frequency of tetrads having at least one CO in I1 *and* at least one CO in I2 (classes D, E, F, G, J, K, L). The expected frequency is obtained by the product of $f_e(CO_{I1})$ and $f_e(CO_{I2})$; where $f_e(CO_{I1})$ is defined as the frequency of tetrads having at least one CO in I1 (classes C, D E, F, G, I, J, K, L), and $f_e(CO_{I2})$ as the frequency of tetrads having at least one CO in I2 (classes B, D E, F, G, H, J, K, L). The CoC is thus defined as $CoC = f_o(2CO) / [f_e(CO_{I1}) \times f_e(CO_{I2})]$. If the observed frequency of double CO is lower than the expected frequency, $CoC < 1$ and interference is detected. If not, CoC is close to 1 and no interference is detected. A khi-square test is performed to test the null hypothesis ($H_0: f_o(2CO) = f_e(CO_{I1}) \times f_e(CO_{I2})$) (Figure S3C).

Genetic map and FTL in hybrids

Hybrids lines were obtained through the crossing of *fancm-1 figl1-1* double mutant in the Columbia-0 background (bearing the tetrad analysis markers, see above, and the *qrt1-2* mutation) with a *fancm-12 figl1-12* double heterozygous mutant in the Landsberg background bearing the *qrt1-1* mutation (Preuss et al., 1994). The F1 plants were heterozygous for the tetrad analysis markers and were used to obtain results of Figure 1C. Seeds from the selfing of double heterozygote (non-mutant control), *figl1*, *fancm* and *figl1*

fancm plants were kept. These seeds were sown and 21 day-old rosettes were collected in extraction plates. DNA extractions were made as in (Giraut et al., 2011).

96 KASPar markers were designed according to their position to satisfy an average distance between two markers of 1.5 Mb. Genotyping was performed using the KASPAR technology at Plateforme Gentyane, 5 chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand, France. Genotyping data were analysed with Fluidigm software (<http://www.fluidigm.com>). 95 markers gave sustaining genotyping results and were further kept for analysis. Results were exported to MapDisto (Lorieux, 2012). Genetic maps were computed with Kosambi parameters (Kosambi, 1943) for each chromosome (in cM, Figure 1D and Figure S5).

To compare the different genotypes, the number of CO per plant was retrieved from the genotyping data. These numbers were then compared between genotypes by a bilateral T-Test (p values are indicated in the main text).

REFERENCES:

- Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y., and Ma, H. (2002). Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* *21*, 3081–3095.
- Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2008). Fluorescent Arabidopsis tetrads: a visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets. *Nat. Protoc.* *3*, 41–50.
- Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2010). Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr. Genomics* *11*, 91–102.
- Berchowitz, L.E., Francis, K.E., Bey, A.L., and Copenhaver, G.P. (2007). The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* *3*, e132.
- Beyer, a (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* *6*, 2043–2058.
- Casanova, M., Crobu, L., Blaineau, C., Bourgeois, N., Bastien, P., and Pagès, M. (2009). Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in Trypanosomatids. *Mol. Microbiol.* *71*, 1353–1370.
- Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M.-P., Mercier, R., and Grelon, M. (2007). Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* *3*, e83.
- Chelysheva, L., Grandont, L., Vrielynck, N., le Guin, S., Mercier, R., and Grelon, M. (2010). An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during Arabidopsis thaliana meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenet. Genome Res.* *129*, 143–153.
- Chelysheva, L., Vezon, D., Chambon, A., Gendrot, G., Pereira, L., Lemhemdi, A., Vrielynck, N., Le Guin, S., Novatchkova, M., and Grelon, M. (2012). The Arabidopsis HEI10 is a new ZMM protein related to Zip3. *PLoS Genet.* *8*, e1002799.
- Chen, C., Jomaa, A., Ortega, J., and Alani, E.E. (2014). Pch2 is a hexameric ring ATPase that remodels the chromosome axis protein Hop1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E44–53.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* *337*, 1222–1225.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D., and Doutriaux, M.P. (1999). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of Arabidopsis. *Plant Cell* *11*, 1623–1634.

Cox, G.A., Mahaffey, C.L., Nystuen, A., Letts, V.A., and Frankel, W.N. (2000). The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat. Genet.* 26, 198–202.

Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* 336, 1588–1590.

Danilowicz, C., Peacock-Villada, A., Vlassakis, J., Facon, A., Feinstein, E., Kleckner, N., and Prentiss, M. (2014). The differential extension in dsDNA bound to Rad51 filaments may play important roles in homology recognition and strand exchange. *Nucleic Acids Res.* 42, 526–533.

Drouaud, J., Mercier, R., Chelysheva, L., Bérard, A., Falque, M., Martin, O., Zanni, V., Brunel, D., and Mézard, C. (2007). Sex-Specific Crossover Distributions and Variations in Interference Level along *Arabidopsis thaliana* Chromosome 4. *PLoS Genet.* 3, e106.

Drouaud, J., Khademian, H., Giraut, L., Zanni, V., Bellalou, S., Henderson, I.R., Falque, M., and Mézard, C. (2013). Contrasted patterns of crossover and non-crossover at *Arabidopsis thaliana* meiotic recombination hotspots. *PLoS Genet.* 9, e1003922.

Frickey, T., and Lupas, A.N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struct. Biol.* 146, 2–10.

Girard, C., Crismani, W., Froger, N., Mazel, J., Lemhemdi, A., Horlow, C., and Mercier, R. (2014). FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers. *Nucleic Acids Research, In press*

Giraut, L., Falque, M., Drouaud, J., Pereira, L., Martin, O.C., and Mézard, C. (2011). Genome-Wide Crossover Distribution in *Arabidopsis thaliana* Meiosis Reveals Sex-Specific Patterns along Chromosomes. *PLoS Genet.* 7, e1002354.

Grelon, M., Vezon, D., and Gendrot, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.*

Higgins, J.D., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H., and Jones, G.H. (2004). The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 2557–2570.

Higgins, J.D., Buckling, E.F., Franklin, F.C.H., and Jones, G.H. (2008a). Expression and functional analysis of AtMUS81 in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J.* 54, 152–162.

Higgins, J.D., Vignard, J., Mercier, R., Pugh, A.G., Franklin, F.C.H., and Jones, G.H. (2008b). AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in *Arabidopsis thaliana*, but is not required for synapsis. *Plant J.* 55, 28–39.

- Hong, S., Sung, Y., Yu, M., Lee, M., Kleckner, N., and Kim, K.P. (2013). The logic and mechanism of homologous recombination partner choice. *Mol. Cell* 51, 440–453.
- Hunter, N., and Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106, 59–70.
- Keeney, S., and Giroux, C.N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*.
- Kosambi, D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.*
- Kurzbauer, M.-T., Uanschou, C., Chen, D., and Schlögelhofer, P. (2012). The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 2058–2070.
- L'Hôte, D., Vatin, M., Auer, J., Castille, J., Passet, B., Montagutelli, X., Serres, C., and Vaiman, D. (2011). Fidgetin-Like1 Is a Strong Candidate for a Dynamic Impairment of Male Meiosis Leading to Reduced Testis Weight in Mice. *PLoS One* 6, e27582.
- Lao, J.P., and Hunter, N. (2010). Trying to avoid your sister. *PLoS Biol.* 8, e1000519.
- Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H., and Reiss, B. (2004). The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10596–10601.
- Lorenz, A., Osman, F., Sun, W., Nandi, S., Steinacher, R., and Whitby, M.C. (2012). The Fission Yeast FANCM Ortholog Directs Non-Crossover Recombination During Meiosis. *Science* (80-.). 336, 1585–1588.
- Lorieux, M. (2012). MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Mol. Breed.* 30, 1231–1235.
- Lupas, A.N., and Martin, J. (2002). AAA proteins. 746–753.
- Macaisne, N., Novatchkova, M., Peirera, L., Vezon, D., Jolivet, S., Froger, N., Chelysheva, L., Grelon, M., and Mercier, R. (2008). SHOC1, an XPF Endonuclease-Related Protein, Is Essential for the Formation of Class I Meiotic Crossovers. *Curr. Biol.* 18, 1432–1437.
- McNally, F.J., and Vale, R.D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75, 419–429.
- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogu  , F., Doutriaux, M.-P., Horlow, C., Grelon, M., et al. (2005). Two Meiotic Crossover Classes Cohabit in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 692–701.

Mukherjee, S., Valencia, J.D.D., Stewman, S., Metz, J., Monnier, S., Rath, U., Asenjo, A.B., Charafeddine, R.A., Sosa, H.J., Ross, J., et al. (2012). Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle* 11, 2359–2366.

Muller, H.J. (1916). The mechanism of crossing-over. *The American Naturalist*, 50(592), 193–221. *Am. Nat.* 50, 193–221.

De Muyt, A., Pereira, L., Vezon, D., Chelysheva, L., Gendrot, G., Chambon, A., Lainé-Choinard, S., Pelletier, G., Mercier, R., Nogué, F., et al. (2009). A High Throughput Genetic Screen Identifies New Early Meiotic Recombination Functions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 5, e1000654.

De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., and Lichten, M. (2012). BLM helicase ortholog Sgs1 is a central regulator of meiotic recombination intermediate metabolism. *Mol. Cell* 46, 43–53.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 34–41.

Nordborg, M., Hu, T.T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., et al. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 3, e196.

Peng, W., Lin, Z., Li, W., Lu, J., Shen, Y., and Wang, C. (2013). Structural insights into the unusually strong ATPase activity of the AAA domain of the *Caenorhabditis elegans* fidgetin-like 1 (FIGL-1) protein. *J. Biol. Chem.* 288, 29305–29312.

Perkins, D.D. (1949). Biochemical Mutants in the Smut Fungus *Ustilago Maydis*. *Genetics* 34, 607–626.

Pradillo, M., López, E., and Linacero, R. (2011). Together Yes But Not Coupled: New Insights in RAD51 and DMC1 Roles in Plant Meiotic Recombination. *Plant Journal*

Preuss, D., Rhee, S.Y., and Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* 264, 1458–1460.

Ross, K.J., Fransz, P., and Jones, G.H. (1996). A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosom. Res.* 4, 507–516.

Sanchez-Moran, E., Osman, K., Higgins, J.D., Pradillo, M., Cuñtildeado, N., Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2008). ASY1 coordinates early events in the plant meiotic recombination pathway. *Cytogenet. Genome Res.* 120, 302–312.

Shinohara, M., Sakai, K., Shinohara, A., and Bishop, D.K. (2003). Crossover Interference in *Saccharomyces cerevisiae* Requires a TID1/RDH54- and DMC1-Dependent Pathway. *1286*, 1273–1286.

Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K., and Sugimoto-Shirasu, K. (2006). Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* *48*, 206–216.

Uanschou, C., Ronceret, A., Von Harder, M., De Muyt, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., Kobayashi, W., Kurumizaka, H., Schlögelhofer, P., et al. (2013). Sufficient amounts of functional HOP2/MND1 complex promote interhomolog DNA repair but are dispensable for intersister DNA repair during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* *25*, 4924–4940.

Vajjhala, P.R., Wong, J.S., To, H.-Y., and Munn, A.L. (2006). The beta domain is required for Vps4p oligomerization into a functionally active ATPase. *FEBS J.* *273*, 2357–2373.

Vale, R.D. (2000). AAA proteins. Lords of the ring. *J. Cell Biol.* *150*, F13–9.

Vignard, J., Siwiec, T., Chelysheva, L., Vrielynck, N., Gonord, F., Armstrong, S.J., Schlögelhofer, P., and Mercier, R. (2007). The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* *3*, 1894–1906.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* *33*, 949–956.

Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C.R., Cooke, H.J., Jasin, M., Keeney, S., et al. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet.* *5*, e1000702.

Yakushiji, Y., Yamanaka, K., and Ogura, T. (2004). Identification of a cysteine residue important for the ATPase activity of *C. elegans* fidgetin homologue. *FEBS Lett.* *578*, 191–197.

YANG, Y., MAHAFFEY, C., BERUBE, N., Nystuen, A., and FRANKEL, W. (2005). Functional characterization of fidgetin, an AAA-family protein mutated in fidget mice. *Exp. Cell Res.* *304*, 50–58.

Youds, J.L., Mets, D.G., McIlwraith, M.J., Martin, J.S., Ward, J.D., O'Neil, N.J., Rose, A.M., West, S.C., Meyer, B.J., and Boulton, S.J. (2010). RTEL-1 enforces meiotic crossover interference and homeostasis. *Science* *327*, 1254–1258.

Yuan, J., and Chen, J. (2013). FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Zhang, D., Rogers, G.C., Buster, D.W., and Sharp, D.J. (2007). Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman-flux” machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* 177, 231–242.

Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33, 603–754.

Acknowledgment

We would like to thank Virgine Larcher and Joiselle Fernandes for their technical help, as well as Yann Duroc for his expertise for the transient expression experiment. We wish to thank Gregory Copenhaver for providing the FTL lines. We also would like to thank the whole Recombination and Meiosis Group of INRA for helpful discussions.

Fundings

European Community’s Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 [KBBE-2009-222883 (MeioSys); ERC 2011 StG 281659 (MeioSight)]. Funding for open access charge: European Community’s Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 [KBBE-2009-222883 (MeioSys); ERC 2011 StG 281659 (MeioSight)].

A provisional patent application based on the work has been filed by INRA.

Table S1 : Mutations of *FIGL1* found in the *zmm* screens

Position of mutation are represented also on Figure 1A and Figure S1B

Alleles		Strain	Position on Chromosome 3 (Columbia genome)	Mutation	Change in DNA sequence	Change in the protein sequence	Position of the amino acid change
<i>hei10(s)141</i>	<i>figl1-3</i>	Col-0	10001970	SNP	C>T	W>STOP	413
<i>sds(s)32</i>	<i>figl1-4</i>	Col-0	10001934	SNP	C>T	R>H	425
<i>hei10(s)326</i>	<i>figl1-6</i>	Col-0	10001904	SNP	C>T	G>D	435
<i>shoc1(s)123</i>	<i>figl1-7</i>	Col-0	10001812	SNP	C>T	splicing site	439
<i>zip4(s)5</i>	<i>figl1-1</i>	Col-0	10001784	deletion	G>0	frameshift	447
<i>msh5(s)652</i>	<i>figl1-8</i>	Col-0	10001772	SNP	C>T	E>K	451
<i>hei10(s)235</i>	<i>figl1-9</i>	Col-0	10001422	SNP	C>T	D>N	497
<i>sds(s)7</i>	<i>figl1-10</i>	Col-0	10001422	SNP	C>T	D>N	497
<i>zip4(s)4</i>	<i>figl1-2</i>	Col-0	10001128	SNP	C>T	splicing site	537
<i>shoc1(s)101</i>	<i>figl1-11</i>	Col-0	10001018	SNP	G>A	L>F	545
<i>msh4(s)80</i>	<i>figl1-12</i>	Ler	10000840	SNP	C>T	L>F	574
<i>msh4(s)65</i>	<i>figl1-13</i>	Ler	10000569	SNP	C>T	A>T	618
<i>hei10(s)208</i>	<i>figl1-14</i>	Col-0	10000328	SNP	C>T	E>K	647
<i>msh5(s)5</i>	<i>figl1-15</i>	Col-0	10000278	SNP	C>T	W>STOP	663
<i>msh5(s)647</i>	<i>figl1-16</i>	Col-0	10000279	SNP	G>A	W>STOP	663

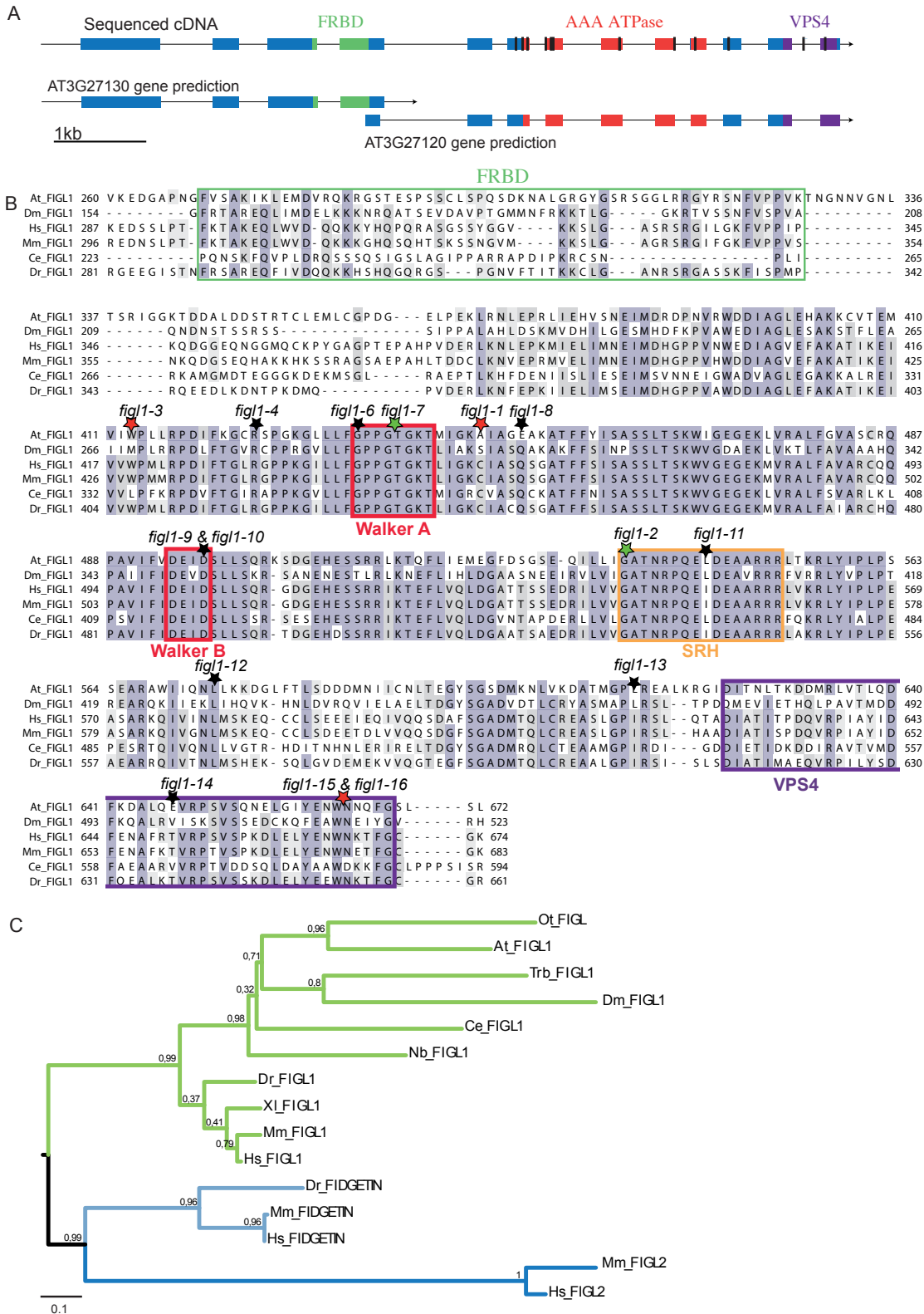


Figure S1: Arabidopsis FIDGETIN-LIKE 1 gene

A: Sequencing of the cDNA revealed a mis-annotation in Arabidopsis thaliana genome database: RT-PCR experiments showed that the two in silico predicted genes AT3G27120 and AT3G27130 are actually a single expressed mRNA *in vivo* (Genbank accession KM055500). **B:** Alignment with T-COFFEE of FIGL1 proteins from *Arabidopsis thaliana* (At), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Caenorhabditis elegans* (Ce) and *Danio rerio* (Dr) showing the FIDGETIN-RAD51-Binding-Domain (FRBD) described in human (Yuan *et al.*, 2013), the conserved Walker A, Walker B and SRH domains of the ATPase domain (Lupas *et al.*, 2002, Ogura *et al.*, 2004) as well as the VPS4 domain for oligomerization (Vajjhala *et al.*, 2006). Positions of the mutations found in the different screens are indicated: black stars indicate amino acid change, red stars indicate mutations to stop codon and green stars indicate mutations affecting splicing site, see also Table S1. **C:** Phylogenetic tree of the FIDGETIN family obtained after alignment with T-COFFEE and subsequent tree calculation (PhyML). The approximate likelihood ratio test statistic values are indicated at each nod. Bar: Estimated nucleotid substitutions per site. Xi: *Xenopus laevis*, Ot: *Ostreococcus tauri*, Nb: *Nosema bombycis*, Trb: *Tripanosome brisei*.

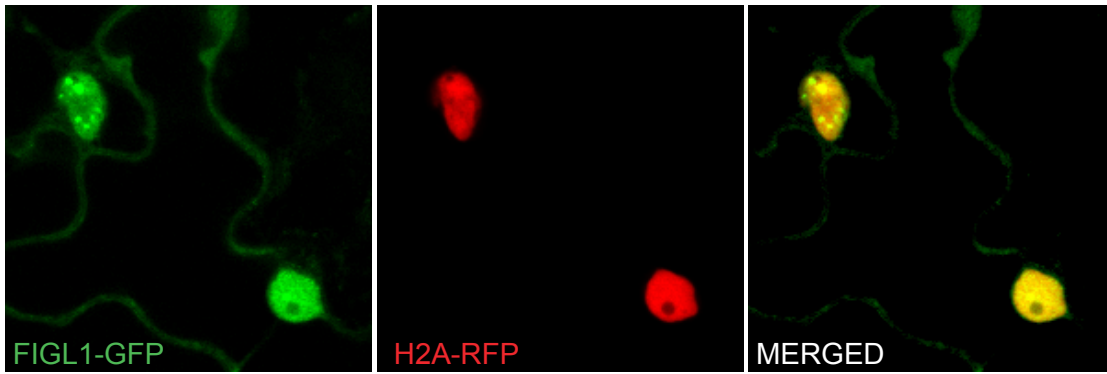



Figure S2 : FIGL1 protein is expressed in the nucleus

Overexpression of FIGL1 fused to GFP fluorescent protein is infiltrated in *N.benthamiana* leaves expressing stable histone H2A-RFP fusion protein. H2A-RFP is specifically expressed in the nuclei of the cells, as is FIGL1-GFP fusion protein.

		I2AB	Total	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Col	Wild type		3256	2759	311	183	2	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>fig1-1</i>		3413	2540	549	263	13	9	17	15	4	2	0	1	0
	<i>fancm</i>		1005	626	239	88	17	11	7	8	6	3	0	0	0
	<i>fig1-1 fancm</i>		1010	372	358	117	34	23	32	34	20	6	11	3	0
Col/Ler	Wild type		1598	1430	108	57	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	<i>fig1-1</i>		1253	1060	110	80	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	<i>fancm</i>		1400	1226	112	60	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	<i>fig1-1 fancm</i>		1138	897	169	69	0	0	0	0	3	0	0	0	0
		I3BC	Total	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Col	Wild type		1896	1071	186	601	8	8	7	4	0	11	0	0	0
	<i>fig1-1</i>		2334	1149	263	705	40	40	42	40	4	33	3	15	0
	<i>fancm</i>		971	287	127	390	30	27	19	38	10	28	7	8	0
	<i>fig1-1 fancm</i>		1009	155	153	305	60	55	79	62	13	58	20	44	5
		I5CD	Total	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Col	Wild type		1831	1392	232	195	2	2	1	2	4	0	1	0	0
	<i>zip4</i>		1210	1058	91	60	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>fig1-1 zip4</i>		1674	1229	245	157	6	12	5	10	3	1	5	1	0
	<i>fig1-1</i>		2152	1323	419	319	16	18	12	19	18	4	2	2	0
	<i>fancm</i>		777	324	179	160	20	26	31	16	9	5	4	3	0
	<i>fig1-1 fancm</i>		584	139	139	111	31	34	27	27	24	13	25	12	2
Col/Ler	Wild type		5445	4696	353	386	1	2	4	0	3	0	0	0	0
	<i>fig1-1</i>		1515	1131	179	184	3	10	2	3	3	0	0	0	0
	<i>fancm</i>		8479	6936	800	706	3	8	12	8	1	5	0	0	0
	<i>fig1-1 fancm</i>		2481	1589	424	373	16	26	14	22	7	5	2	3	0

Col	Wild type cM	+/-	<i>zip4</i> cM	+/-	<i>fig1-1 zip4</i> cM	+/-	<i>fig1-1</i> cM	+/-	<i>fancm-1</i> cM	+/-	<i>fig1-1 fancm-1</i> cM	+/-
I2a	2,86	0,20	NA	NA	NA	NA	4,91	0,29	7,41	0,73	15,10	1,09
I2b	4,82	0,26	NA	NA	NA	NA	10,33	0,52	15,82	0,99	33,17	1,68
I3b	5,62	0,36	NA	NA	NA	NA	9,20	0,37	18,07	1,40	33,75	1,83
I3c	18,30	0,73	NA	NA	NA	NA	24,81	0,96	37,44	1,83	60,60	2,69
I5c	7,35	0,53	3,80	0,38	9,77	0,67	14,08	0,75	22,72	1,55	49,32	3,36
I5d	5,54	0,37	2,52	0,31	6,18	0,46	9,80	0,53	19,63	1,33	35,70	2,61
Col/Ler	Wild type cM	+/-	Ratio compared to wild type 				<i>fig1-1</i> cM	+/-	<i>fancm-1</i> cM	+/-	<i>fig1-1 fancm-1</i> cM	+/-
I2a	3,63	0,37					5,11	0,57	4,25	0,42	8,22	0,69
I2b	1,85	0,24					3,19	0,35	2,18	0,27	3,03	0,35
I5c	3,47	0,19					7,10	0,55	4,94	0,17	11,27	0,53
I5d	3,61	0,18					6,67	0,44	4,52	0,17	10,10	0,51

		Col					
		WT	<i>zip4</i>	<i>zip4 fig1</i>	<i>fig1</i>	<i>fancm</i>	<i>fig1 fancm</i>
I2ab	Interference ratio	0,16	-	-	0,93	1,02	1,16
	CoC	0,17	-	-	0,96	1,12	1,03
I3bc	Interference ratio	0,29	-	-	1,05	0,68	0,91
	CoC	0,38	-	-	1,02	0,86	0,97
I5cd	Interference ratio	0,41	0,21	1,82	0,67	1,00	1,11
	CoC	0,30	0,22	1,15	0,75	1,02	1,02

χ^2 test when possible

p(IR=1) or p(Coc=1) ≤ 0,01

p(IR=1) or p(Coc=1) ≤ 0,05

p(IR=1) or p(Coc=1) > 0,05

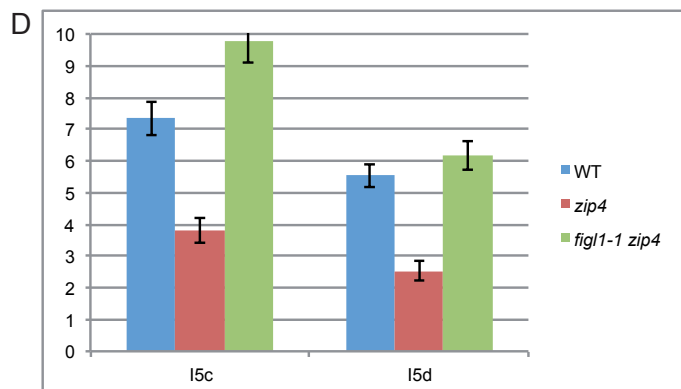


Figure S3: Tetrad analysis experiment data

A: Tetrad count for all categories (A to L) designed by G. Copenhaver and colleagues (Berchowitz *et al.*, 2008) for every genotype in all experiments (pure Columbia-0 and hybrid Col/Ler). **B:** Genetic distances calculated with Perkins equation (Perkins, 1949) from the data of (A). **C:** Interference ratios (Stahl, 2008) and coefficients of coincidence (CoC, Shinohara *et al.*, 2008) calculated with data from (A). When Khi square tests are possible, p-value are given and colored following their value for the H0 hypothesis "IR=1" or "CoC=1". **D:** Mutation in *FIGL1* restores CO frequency in a *zip4* background based on tetrad analysis on two intervals of chromosome 5.

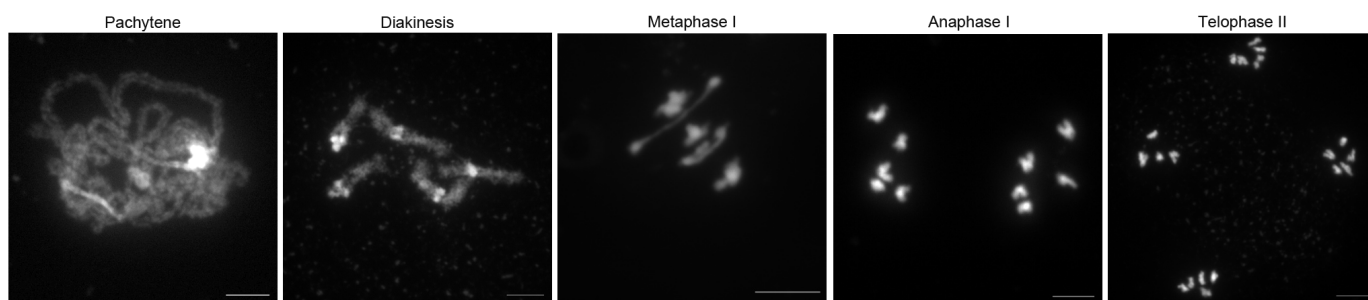


Figure S4: *figl1 fancm* meiosis proceeds normally.

Male meiocyte chromosome spreads stained with DAPI show a normal behaviour of chromosomes throughout meiosis

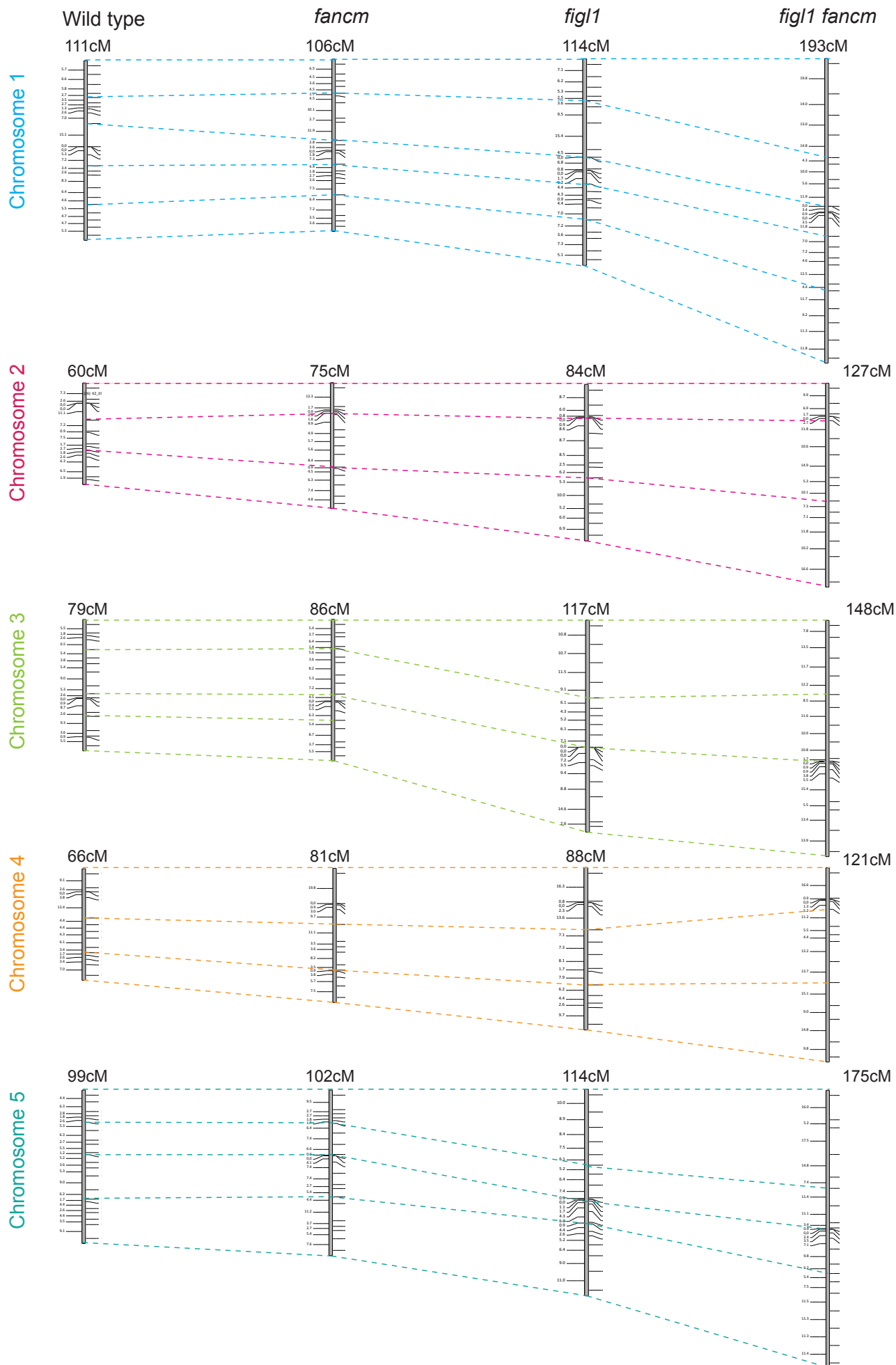


Figure S5: Genetic maps of all five chromosomes in wild type, *figl1*, *fancm* and *figl1 fancm* mutants. Size of each interval and each chromosome is indicated in cM, measured with Kosambi equation (Kosambi, 1943).

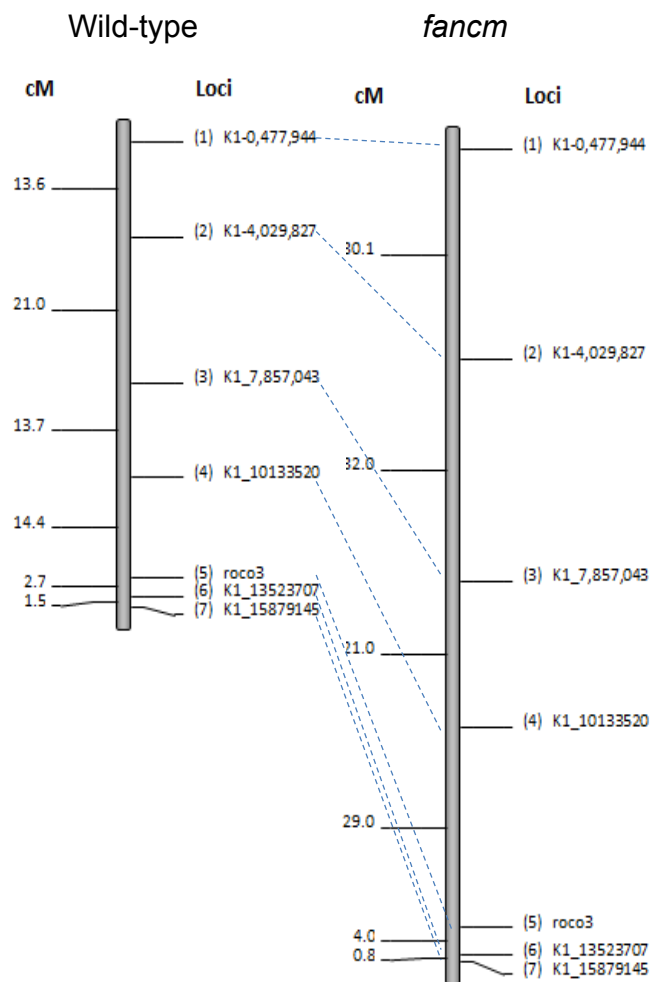


Figure S6 : Genetic map in pure Columbia of wild type and *fancm* mutant, using specific EMS mutations of *fancm-2* and *fancm-1* mutants as genotyping markers.

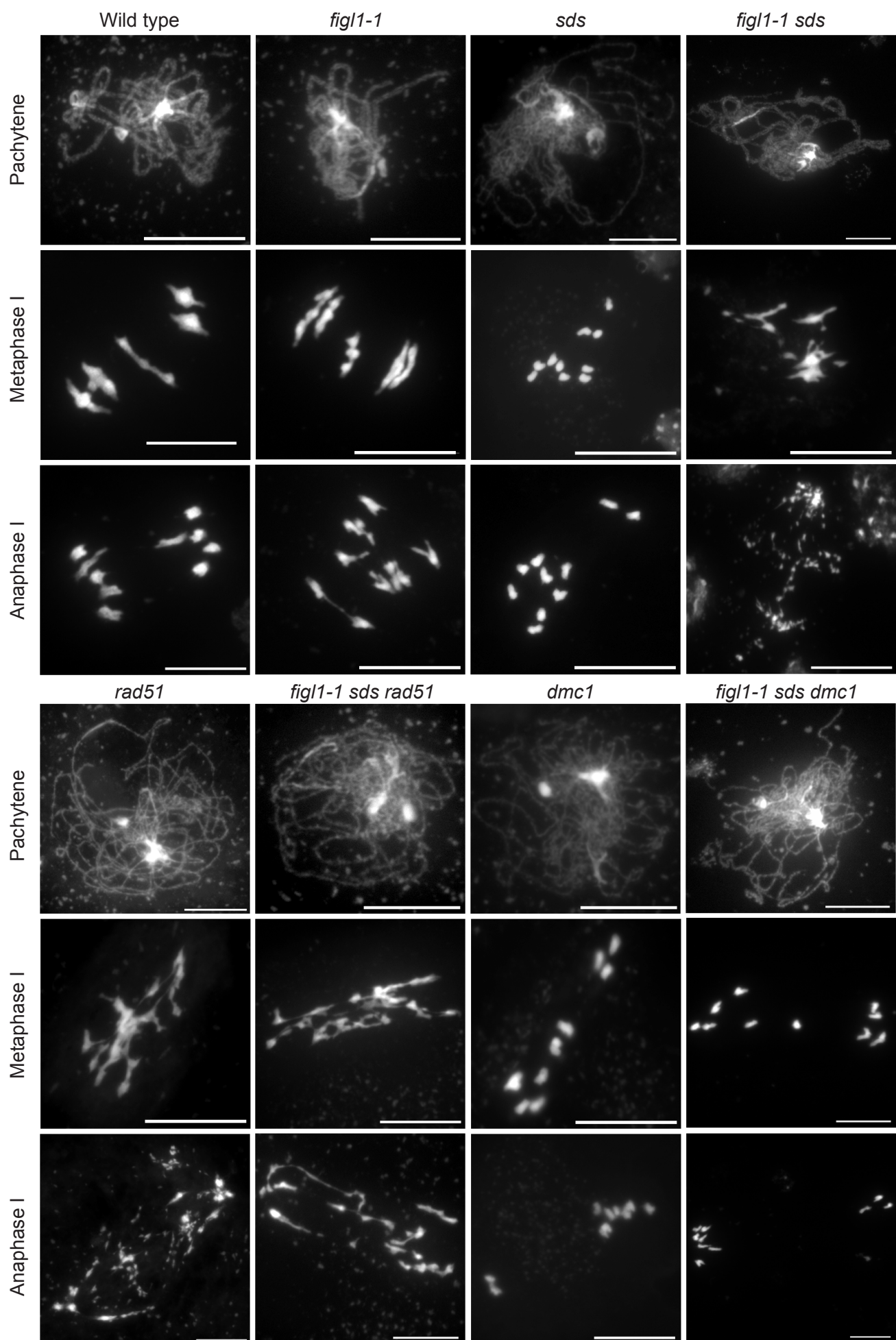


Figure S7 : Meiosis in *figl1 sds*, *figl1 sds rad51* and *figl1 sds dmc1*. Chromosome spreads from male meiocytes of each mutant colored with DAPI.

3.3 Résultat supplémentaire

3.3.1 *figl1* haploïde

Nous avons étudié l'effet de la mutation de *FIGL1* dans un contexte haploïde. Des plantes d'*Arabidopsis* haploïdes sont obtenues par croisement avec une lignée *GFP-Tailswap* portant une version mutée d'une protéine centromérique, CENH3 (RAVI et al. 2010). Cette lignée *GFP-Tailswap* (TS) est capable de se reproduire par autofécondation comme une plante sauvage. Lorsqu'une plante TS est utilisée pour polliniser une plante mère portant une version sauvage de CENH3, le génome provenant de TS qui porte des protéines CENH3 mutées est éliminé peu de temps après la fécondation (RAVI et al. 2010). Les graines issues d'un tel croisement ne donc portent qu'un seul génome parental (provenant de la plante mère sauvage), et sont donc haploïdes. En croisant une lignée TS avec un mutant *figl1*, j'ai pu obtenir des plantes haploïdes portant la mutation *figl1*. La méiose des mutants *figl1* haploïdes est identique à celle d'un sauvage haploïde (Figure 3.1) : les cinq chromosomes ségrègent aléatoirement vers l'un ou l'autre pôle de la cellule en première division. Les chromatides sœurs se séparent correctement en seconde division, menant à la formation de quatre lots de chromatides aneuploïdes.

Ces données suggèrent que FIGL1 n'est pas nécessaire pour la réparation sur la chromatide sœur.

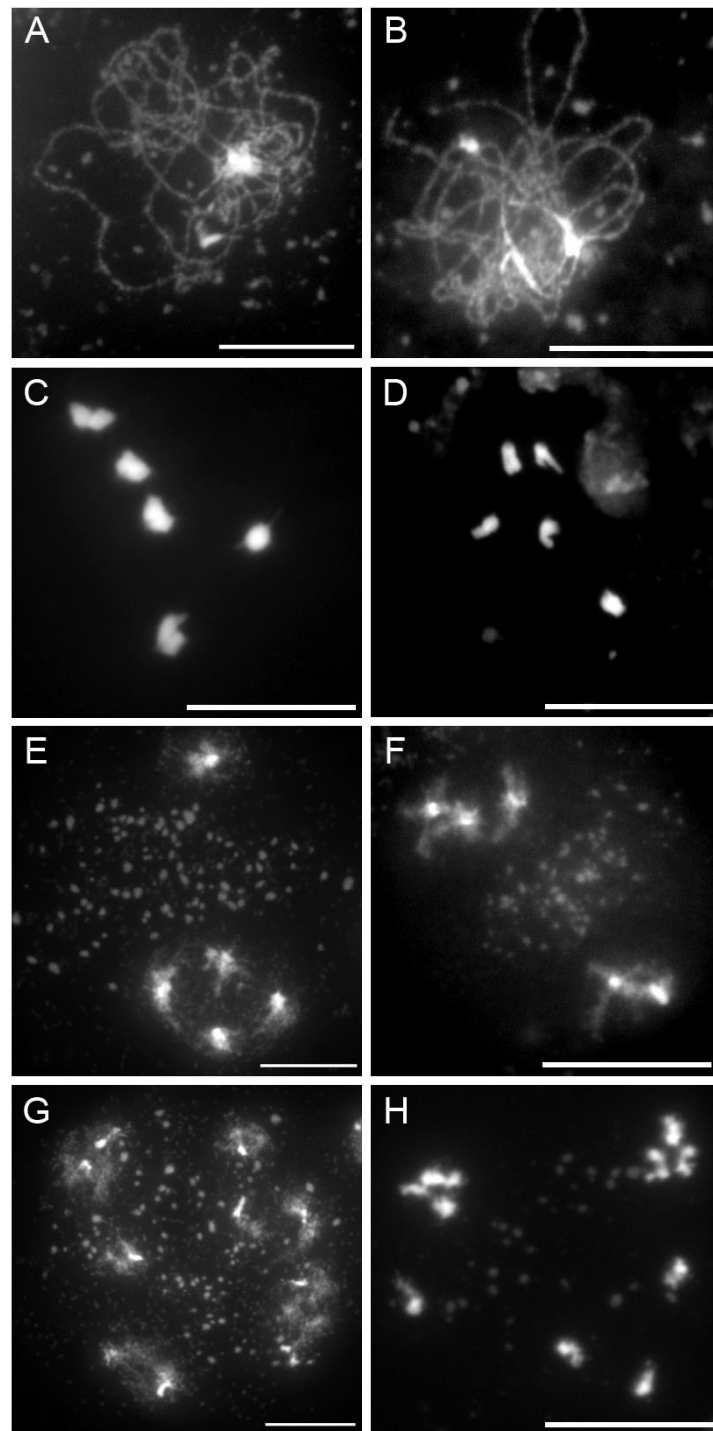


FIGURE 3.1 – La méiose chez l'haploïde sauvage (A, C, E, G) et mutant pour *figl1* (B, D, F, H) sont similaires : en pachytène (A-B) aucun signe de synapsis n'est observable ; en métaphase I (C-D) les cinq chromosomes homologues apparaissent sous forme d'univalents qui ségrègent aléatoirement pour former deux lots en télophase I (E-F). En télophase II (G-H), les chromatides sœurs forment quatre lots de chromosome aneuploïdes.

TROISIÈME PARTIE

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés ont permis de mettre en évidence deux voies de régulation de la formation des crossovers en méiose chez *Arabidopsis*. La première dépend des protéines FANCM, MHF1 et MHF2 qui sont aussi impliquées toutes les trois dans une même voie de réparation de l'ADN, la voie de l'anémie de Fanconi (FA). La deuxième voie de régulation des CO dépend de la protéine FIDGETIN-Like-1 (FIGL1), une AAA-ATPase conservée mais dont les fonctions décrites chez les autres espèces ne permettent pas d'en dégager une fonction univoque claire.

Je m'attacherai donc dans ce chapitre à discuter les hypothèses des différents modes d'actions de ces protéines en méiose, en relation avec leur fonction anti-crossover.

1.2 La voie FA et la recombinaison méiotique

1.2.1 MHF1, MHF2 et FANCM : trois protéines, une voie de régulation

FANCM limite, avec MHF1 et MHF2, la formation des CO chez *Arabidopsis*, et ce indépendamment des autres protéines de la voie FA. La voie FA n'a pas été caractérisée chez les plantes en tant que telle mais plusieurs arguments indiquent qu'elle serait conservée. Tout d'abord, chaque sous-groupe fonctionnel (*core complex*, FA-ID, partenaires en aval) semble conservé puisqu'on trouve des gènes de chaque sous-groupe dans le génome de l'arabette. La voie FA est une voie de réparation de l'ADN, et l'on s'attend donc à ce que les mutants présentent des défauts liés à cette fonction. Les simples mutants *fancm* et *mhf1* ne présentent pas de défaut de développement et ne sont pas sensibles aux agents réticulant de l'ADN (mitomycine C, MMC). Mais il s'avère que le double mutant *fancm mus81* présente des défauts de développement somatique (CRISMANI et al. 2012) et que le double mutant *mhf1 recq4a* est plus affectés par la MMC que les simples mutants (DANGEL et al. 2014; KNOLL et al. 2011). Ces résultats impliquent FANCM et MHF1 dans une voie de réparation de l'ADN en parallèle de RECQ4A/MUS81.

Chez les mammifères, FANCM, MHF1 et MHF2 sont capables de s'associer en sous-complexe indépendamment des autres partenaires de la voie FA (SINGH et al. 2010; YAN et al. 2010). Il est probable que cette organisation en sous-complexe soit conservée chez

Arabidopsis et que ce sous-complexe ait acquis un rôle méiotique en relation avec leur fonction biochimique de débobinage de l'ADN. Chez les mammifères, la protéine FANCM purifiée seule a une affinité assez faible pour l'ADN (CICCIA et al. 2007; ZHAO et al. 2013). Lorsqu'elle forme un complexe avec MHF1 et MHF2, son affinité pour l'ADN double brin et les structures branches est augmentée (YAN et al. 2010), et son activité hélicase est stimulée (SINGH et al. 2010). MHF1 et MHF2 seraient donc essentielles au recrutement de FANCM sur les intermédiaires de recombinaison, et pour stimuler son activité. Nos résultats sont cohérents avec ces hypothèses : les mutants *mhf1* et *mhf2* présentent une activité anti-CO moins forte que *fancm* : en absence de ses deux cofacteurs, FANCM garderait une certaine activité anti-CO, comme cela a été montré chez *S.pombe* (LORENZ et al. 2012).

1.2.2 Un rôle pro CO des autres protéines fanconi ?

En dehors de FANCM, MHF1 et MHF2, les autres protéines de la voie FA conservée chez *Arabidopsis* ne sont pas des protéines anti-CO méiotiques. Les étalements de chromosomes des méiocytes des simples mutants *fancd2*, *fance*, *fanci* et *fanc1* ont révélé la présence d'une fréquence, faible, d'univalents. Ce résultat suggère donc que FANCD2, FANCE, FANCI et FANCL pourraient avoir un rôle pro-crossover chez *Arabidopsis*. Ce résultat fait écho aux recherches menées par l'équipe de Peter Schlögelhofer à l'Institut Max F. Perutz à Vienne (résultats non publiés de la thèse de René Ladurner, disponible sur http://othes.univie.ac.at/3292/1/2009-01-14_0106572.pdf) qui montrent que les doubles mutants *fancd2 atm* sont très stériles, plus que le simple mutant *atm*, principalement à cause de l'apparition de fragmentation en anaphase I. ATM est une kinase essentielle pour déclencher la réponse aux dommages de l'ADN (MARÉCHAL et al. 2013). Leur résultat implique que FANCD2 pourrait avoir un rôle de promotion de la réparation des cassures double-brin en méiose, parallèle à ATM. Il serait donc intéressant d'explorer le rôle des protéines Fanconi pour leur rôle pro-crossover, en s'attachant notamment à comprendre quelle classe de crossover est diminuée chez les mutants, et à quelle étape de la recombinaison homologue pourraient jouer ces protéines.

1.2.3 FANCM, RTEL-1, SGS1 : dissociation des D-loop ?

La formation de la D-loop est un carrefour de la recombinaison homologue méiotique, et la régulation de son devenir aurait donc un impact majeur sur la fréquence et la nature des événements de recombinaison. Parmi les quelques rares protéines anti-CO méiotiques identifiées chez les eucaryotes, trois (RTEL-1, SGS1 et FANCM) sont

des hélicases, protéines connues pour utiliser l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (ou du GTP) pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques double brins. Ces trois enzymes interagissent donc directement avec l'ADN, et sont capables de prendre en charge des intermédiaires de recombinaison pour les faire changer de conformation. Elles ont toutes les trois une activité de dissociation des D-loop (BARBER et al. 2008 ; BRABANT et al. 2000 ; PRAKASH et al. 2009), qui serait à la base de leur activité anti-CO.

Ces trois protéines anti-CO ont été découvertes dans des espèces différentes (*C.elegans*, *S.cerevisiae*, *S.pombe* et *Arabidopsis thaliana*, CRISMANI et al. 2012 ; DE MUYT et al. 2012 ; LORENZ et al. 2012 ; YOUNDS et al. 2010). FANCM pourrait-elle jouer le rôle de SGS1 ou RTEL-1 chez *Arabidopsis* ? Un premier contre-argument vient du fait qu'il existe des homologues de SGS1 et de RTEL-1 dans le génome d'*Arabidopsis*. RTEL-1 faisait partie de nos candidats favoris pour nos cribles supprimeurs des *zmm*, mais *rtel-1* n'est pas capable de supprimer un mutant *zmm* (données personnelles du laboratoire, W. Crismani et M. Séguéla). Chez *C.elegans*, les extra-CO présents chez le mutant *rtel-1* sont dépendants des ZMM et de MUS81 (YOKOO et al. 2012 ; YOUNDS et al. 2010). Il est donc encore possible que RTEL-1 ait un rôle anti-CO chez *Arabidopsis thaliana*, mais ne soit pas capable de supprimer la semi-stérilité et le manque de bivalent d'un *zmm*. La mesure de la fréquence de CO par analyse de tétrades dans le simple mutant *rtel-1* apportera la réponse à cette question. Il existe sept protéines homologues à SGS1 dans le génome d'*Arabidopsis*, dénommées protéines RECQ. La protéine RECQ4A d'*Arabidopsis* est capable de compléter un mutant *sgs1* de levure lors de test de résistance à la MMC, et serait donc l'homologue fonctionnel le plus probable de SGS1 chez *Arabidopsis* (BAGHERIEH-NAJJAR et al. 2005). REC4B est un paralogue de RECQ4A présentant 70% d'identité avec ce dernier. Une étude a proposé que RECQ4A et RECQ4B pourraient avoir des rôles antagonistes sur la recombinaison somatique (HARTUNG et al. 2007). Nous avons pu montrer dans le laboratoire que RECQ4A et RECQ4B étaient toutes les deux des protéines anti-CO impliquées dans la même voie de régulation du nombre de CO chez *Arabidopsis* de façon non redondante (données personnelles, Mathilde Séguéla et Wayne Crismani).

FANCM et SGS1 ont aussi une activité biochimique, décrite *in vitro* et en cellules somatiques, de dissolution des doubles jonctions de Holiday par migration de branches (CEJKA et al. 2012 ; GARI et al. 2008 ; SUN et al. 2008 ; WU et al. 2003). SGS1 jouerait son rôle anti-CO méiotique au travers de ces deux activités (dissolution de D-loop et dissolution de dHj, DE MUYT et al. 2012). Ni nos données génétiques ni celles de nos collègues chez *S.pombe* sur FANCM ne permettent d'écarter un rôle de dissolution des dHj méiotiques.

1.2.4 Effet de *fancm* en fond hybride

Si FANCM est un régulateur majeur de la recombinaison méiotique en fond isogénique, nos données montrent que son activité anti-CO est fortement diminuée en fond hybride. Les raisons de cette différence d'efficacité sont encore inconnues. Quelles sont les différences entre un hybride et une lignée pure ? La plus évidente est la divergence de séquence nucléotidique (polymorphisme : SNP et insertions/délétions). Deux hypothèses peuvent alors être proposées. La première est que le polymorphisme empêche la formation d'intermédiaires qui sont formés en fond pur. Ce manque d'intermédiaires diminuerait le rôle de FANCM pour limiter le nombre de CO. Cette hypothèse est mise à mal : (i) par le fait que la divergence de séquence entre les différentes accessions d'*Arabidopsis* est assez faible, de l'ordre de 0,5% avec en moyenne un SNP toutes les 250-300pb (NORDBORG et al. 2005), or les pistes des conversions géniques, associées ou non aux CO, sont assez courtes (DROUAUD et al. 2013) ce qui laisse penser que les D-loop sont de taille restreinte et ont peu de chance de contenir un SNP ; (ii) si le nombre d'invasions est diminué en fond hybride par rapport au fond pur, l'effet de FIGL1 serait aussi diminué, or ce n'est pas le cas.

Si le polymorphisme n'a pas d'effet à l'échelle locale, il peut en avoir à l'échelle du chromosome. En effet, les événements de recombinaison ectopiques, entre deux séquences non alléliques, sont très rares, même dans les régions qui présentent des séquences répétées et qui sont indiscernables l'une de l'autre sur plusieurs centaines de paires de bases. De plus, chez les allopolyploïdes, qui présentent des chromosomes homéologues en plus des chromosomes homologues, la recombinaison se déroule toujours entre chromosomes homologues et jamais entre chromosomes homéologues. Il existe donc des mécanismes de détection de l'hétérologie à l'échelle du chromosome pour distinguer quelles sont les séquences alléliques, et quelles sont les séquences ectopiques. Un bon argument en faveur d'un tel mécanisme est la mise en évidence de loci contrôlant la recombinaison homéologue chez le blé et le colza (*PH1* et *PrBn*, voir Introduction 2.3.6 page 50). Une hypothèse pour expliquer l'absence d'effet de FANCM en fond hybride pourrait être que de tels mécanismes régulent les mêmes étapes que FANCM : ces deux mécanismes sont alors redondants en fond hybride, alors que FANCM joue seul en lignée pure. Là encore, l'on peut se demander quelles sont les caractéristiques de FANCM et de FIGL1 qui font que leur effet est, ou non, affecté en fond hybride par rapport aux lignées pures.

L'étude de ce phénomène et de ses causes est particulièrement intéressante, et peut nous apprendre beaucoup sur la régulation des événements de recombinaison. Nous avons énoncé deux hypothèses : une régulation de l'action de FANCM à l'échelle locale ou à l'échelle du chromosome. Une façon d'aborder ce problème serait d'étudier le compor-

tement méiotique de lignées hétérozygotes pour différentes parties du génome, et fixées homozygote sur le reste du génome. Il serait alors envisageable d'analyser les taux de recombinaison de chaque lignée par analyse de tétrades puis de les séquencer pour connaître les caractéristiques génétiques des lignées hyper-recombinantes ou hypo-recombinantes.

1.3 FIGL1 : une nouvelle protéine méiotique

1.3.1 Qui est FIGL1 ?

FIGL1 est une AAA-ATPase de fonction inconnue chez les plantes et dont les fonctions décrites chez les autres espèces ne permettent pas *a priori* de prédire son implication dans la régulation de la fréquence de CO en méiose. La puissance des cribles de génétique directe tient à cela : identifier de nouveaux acteurs insoupçonnés.

Lors de l'identification de *figl1* comme suppresseur des *zmm*, les données impliquant FIGL1 comme protéine pouvant sectionner les microtubules nous ont d'abord pousser à formuler des hypothèses sur un éventuel rôle du cytosquelette sur la recombinaison méiotique, comme cela avait été montré chez de nombreuses espèces (HIRAOKA et al. 2009). Nous avons donc cherché à montrer que FIGL1 pouvait s'associer aux microtubules. Lors d'expériences d'expression transitoire de *FIGL1*, nous avons alors découverts que FIGL1 serait plus probablement une protéine nucléaire. Les données chez l'Homme sur le lien entre FIGL1 et RAD51 publiées en 2013 (YUAN et al. 2013) ont achevées de nous convaincre que le rôle de FIGL1 n'avait très probablement rien à voir avec les microtubules.

Notre modèle d'action pour FIGL1 sur la régulation de l'invasion simple brin est basé sur des données biochimiques obtenues chez d'autres espèces. Nous proposons en particulier que la fonction de désassemblage de macromolécules soit conservée chez la protéine FIGL1 d'*Arabidopsis*. *AtFIGL1* possède notamment deux domaines fondamentaux pour cette fonction : le domaine dit VPS4, qui est important pour l'oligomérisation (LUPAS et al. 2002 ; VAJJHALA et al. 2006) ; et le domaine AAA-ATPase, important pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (voir Introduction). Toutes les mutations isolées dans le crible se trouvent dans ces deux domaines, ce qui démontre que ces deux domaines sont importants pour la fonction anti-CO de FIGL1. Le domaine FRBD de liaison à RAD51 décrit chez la protéine humaine (FIGNL1, YUAN et al. 2013) semble aussi conservé chez *Arabidopsis*, mais aucune mutation n'a été isolée dans cette partie du gène lors de nos cribles. Une mutation par insertion d'un T-DNA au début de ce domaine est pourtant capable de supprimer la semi-stérilité d'un mutant *zip4*. Il est probable que cette insertion mène à la délétion de toute la partie C-terminale de la protéine. Notre hypothèse est qu'une seule mutation ne soit pas capable d'altérer suffisamment le domaine pour inhiber l'interaction

avec RAD51, mais il est aussi envisageable que le domaine FRBD ne soit pas nécessaire à la fonction anti-CO de FIGL1.

1.3.2 Ce que l'étude de *figl1* nous apprend sur DMC1 et RAD51

L'étude des interactions génétiques entre FIGL1 et les acteurs du biais (RAD51, DMC1, SDS, ASY1) a permis de révéler plusieurs caractéristiques de ces acteurs eux-mêmes.

La fonction de la cycline SDS chez *Arabidopsis* n'est pas bien déterminée (AZUMI et al. 2002 ; DE MUYS et al. 2009). Le phénotype du mutant *sds* n'est pas discernable de celui de *dmc1* : le synapsis est aboli, aucun foyer DMC1 n'est observable, aucun crossover ni bivalent ne sont formés, menant à la ségrégation aléatoire des chromosomes homologues en première division de méiose (AZUMI et al. 2002 ; COUTEAU et al. 1999 ; DE MUYS et al. 2009). Le double mutant *figl1 sds* présente une restauration du synapsis, une restauration des foyers DMC1 ainsi que la formation de bivalents en métaphase I, mais présente aussi de la fragmentation chromosomique en anaphase I. Ces résultats impliquent que :

- (i) SDS n'est pas fondamentalement nécessaire pour le synapsis, mais en fond *sds* la présence de FIGL1 inhibe le synapsis ;
- (ii) SDS n'est pas fondamentalement nécessaire à la formation des foyers DMC1, mais en fond *sds* la présence de FIGL1 provoque le déchargement de DMC1 ou empêche son chargement ; SDS aurait donc un rôle activateur ou stabilisateur de DMC1 ;
- (iii) SDS n'est pas fondamentalement nécessaire au biais vers l'homologue pour former des bivalents ; mais en fond *sds*, FIGL1 empêche la formation de ces bivalents ;
- (iv) en fond *sds* les intermédiaires de recombinaison peuvent être réparés sur la sœur en présence de FIGL1, mais en absence de FIGL1, cette réparation est compromise.

Tous ces phénotypes sont dépendants de DMC1. En effet, le triple mutant *figl1 sds dmc1* ressemble en tout point au mutant *dmc1*, indiquant que :

- (i) le synapsis et la formation des bivalents observés dans le mutant *figl1 sds* dépendent de DMC1 (de plus, ces phénomènes dépendent aussi de RAD51) ;
- (ii) la fragmentation observée dans le double mutant *figl1 sds* est levée par la mutation *dmc1* impliquant que DMC1 inhiberait RAD51 en absence de FIGL1 et SDS.

L'ensemble de ces résultats tendent à montrer que l'activité de DMC1 (au sens large : chargement, stabilisation, régulation de l'activité d'échange de brin) est régulée par des forces contraires, SDS ayant un rôle activateur et FIGL1 un rôle inhibiteur.

Il a été montré chez la levure que RAD51 est un cofacteur de DMC1, et que c'est l'activité d'échange de brin de DMC1, et non celle de RAD51, qui est important pour la

formation des CO en méiose (CLOUD et al. 2012). Des données supportant ce modèle ont été rapportées chez *Arabidopsis* (DA INES et al. 2013). A l'inverse, DMC1 inhibe l'activité de RAD51 (Résultats et HONG et al. 2013; UANSCHOU et al. 2014). Dans le cadre de notre modèle, DMC1 et RAD51 sont chargés sur la chromatine et forment le filament présynaptique, RAD51 activant DMC1 et DMC1 inhibant RAD51. Dans un mutant *figl1*, plus d'intermédiaires portant DMC1 et RAD51 seraient maintenus, promouvant plus d'invasion sur le chromosome homologue et plus de CO. En absence de SDS, DMC1 n'est plus présent sur la chromatine, probablement par l'action de FIGL1. On peut envisager que, en fond *sds*, FIGL1 serait nécessaire à la déstabilisation du filament présynaptique pour induire une réorganisation de DMC1 et RAD51, permettant ainsi la réparation sur la sœur. Chez le sauvage, les forces contraires de FIGL1 et SDS aboutiraient à un équilibre dynamique, permettant la formation des CO observée. En absence de FIGL1 et de SDS, le réarrangement des recombinaisons ne serait plus possible, et ni DMC1 (non activé) ni RAD51 (toujours inhibé par DMC1) ne seraient capables de réparer les DSB, menant à la fragmentation observée.

Le mutant *asy1* présente un défaut de synapsis et de formation des CO (DE MUYT et al. 2009; SANCHEZ-MORAN et al. 2008; SANCHEZ-MORAN et al. 2007). Le double mutant *figl1 asy1* présente le même défaut de synapsis que *asy1* mais présente de la fragmentation chromosomique en anaphase I. Cette fragmentation pourrait signifier que, comme dans le double mutant *figl1 sds*, DMC1 soit chargée et inhibe RAD51, mais ne soit pas activé pour l'échange de brins. les foyers DMC1 semblent être absents dans *asy1*, il pourrait donc être intéressant de savoir s'ils sont restaurés en fond *asy1 figl1*. Il est aussi probable que la fragmentation du double mutant *figl1 asy1* soit aussi dépendante de DMC1, et il serait intéressant de le confirmer.

1.3.3 Comment caractériser la fonction de FIGL1

Notre modèle présomptif sur le mode d'action de FIGL1 comme protéine anti-CO est basé sur ce que l'on sait des AAA-ATPases et de FIGL1 en particulier chez les autres espèces. Notamment, la protéine FIGL1 humaine et de *C.elegans* s'assemblent en hexamère, structure tridimensionnelle canonique pour les AAA-ATPases (PENG et al. 2013; YUAN et al. 2013). De plus, la protéine FIGL1 humaine interagit avec RAD51 (YUAN et al. 2013). L'étude de ces propriétés chez *Arabidopsis* est donc requise pour valider notre modèle chez *Arabidopsis*.

Notre modèle implique que FIGL1 est capable de renvoyer les invasions sur le chromosome homologue vers la chromatide sœur. Or ces invasions mènent à la formation de CO et de NCO. Une des prédictions de ce modèle serait donc une augmentation du nombre

de NCO dans le mutant *figl1* parallèle à l'augmentation du nombre de CO. Il serait intéressant de tester cette hypothèse, notamment en se basant sur le séquençage de tétrades qui permet d'avoir accès à tous les événements de recombinaison au sein d'une méiose et notamment aux événements de conversion génique, associés ou non aux crossovers (LU et al. 2012; WIJNKER et al. 2013).

D'autre part, des tests *in vitro* de l'activité de FIGL1 pourraient confirmer son rôle de disruption de la formation de la D-loop. L'incubation de DMC1 et RAD51 avec un fragment d'ADN simple brin (ssDNA) complémentaire d'un plasmide permet de tester la formation de D-loop par échange de brin entre le plasmide et le ssDNA (*D-loop assay*, voir par exemple UANSCHOU et al. 2014). L'ajout de FIGL1 pourrait perturber le rendement de formation de ces D-loop.

L'étude des interactants de FIGL1 pourrait aussi nous éclairer sur son mode d'action. RAD51 et AKAP95 ont été isolés comme interagissant spécifiquement avec FIGL1 chez l'humain (YUAN et al. 2013). Nous avons testé l'interaction entre RAD51 et FIGL1 d'*Arabidopsis* en double hybride chez la levure, sans que le résultat soit concluant. AKAP95 est une protéine de fonction inconnue qui n'est pas conservée chez les plantes. Des expériences de co-précipitation en prenant comme appât FIGL1 ont été lancées (TAP-TAG sur la plateforme de biochimie de l'Université de Gent, Belgique). Ces expériences sont réalisées à partir d'extraits protéiques de cellules d'*Arabidopsis* en culture. Ce sont donc des cellules somatiques, et même si leur transcriptome est dérégulé par rapport à des cellules intègres de feuilles, les protéines méiotiques sont grandement sous-représentées. Cette technique a donc ses limites dans un cadre d'étude comme le notre mais pourra peut-être quand même offrir des pistes intéressantes quant à la fonction de FIGL1.

Les interactants des AAA-ATPases reconnaissent principalement des domaines N-terminal. Il pourrait donc être intéressant de pousser les analyses de séquences de FIGL1 pour isoler des domaines N-terminaux conservés, au niveau de leur séquence primaire mais aussi peut-être au niveau de leur repliement structural. Muter le domaine Walker B peut aussi être une stratégie d'identification des substrats. La majorité des enzymes AAA lient leur substrat après liaison à l'ATP, et le relâche après hydrolyse en ADP. En mutant les résidus empêchant l'hydrolyse mais pas la liaison à l'ATP du domaine Walker B (E vers Q), il serait possible de co-immunoprécipiter les interactants spécifiques de l'enzyme, comme cela a été montré pour Vps4 (BABST et al. 1998) et Pch2 (CHEN et al. 2014).

1.3.4 La fonction de FIGL1 est-elle conservée ?

La fonction anti-CO méiotique de FIGL1 peut-elle être conservée chez les autres espèces ? D'un point de vue de la séquence, il est difficile de départager les protéines FIGL1

impliquées dans la liaison aux microtubules (chez la drosophile en particulier), de celles qui semblent être localisées dans le noyau (chez l'Homme et *C.elegans* par exemple). Notamment, le domaine FRBD de liaison à RAD51 semble présent chez toutes ces espèces (YUAN et al. 2013). En théorie, rien ne s'oppose donc à ce que la fonction anti-CO de FIGL1 puisse être conservée chez d'autres espèces. Chez la souris, FIGNL1 est exprimée dans les méiocytes au stade pachytène (L'HÔTE et al. 2011). Chez *C.elegans*, le mutant *figl-1* montre aussi une stérilité marquée, due à un problème de différenciation de la lignée germinale : chez ce mutant, les noyaux mitotiques de la zone de prolifération s'accumulent et ne semblent jamais entrer en méiose (LUKE-GLASER et al. 2007). Le fait que FIGL1 puisse avoir plusieurs rôles (de sectionnement des microtubules et un rôle anti-CO) implique qu'elle puisse être recrutée pour l'un, l'autre ou les deux rôles chez les différentes espèces. La mutation de FIGL1 pourrait alors entraîner des défauts pléiotropes, et son rôle anti-CO pourrait être caché par d'autres problèmes de développement ou de mise en place de la lignée germinale.

Une question se pose : FIGL1 pourrait-elle être l'homologue fonctionnel de PCH2 de *S.cerevisiae* chez *Arabidopsis* ? En effet, PCH2 et FIGL1 semblent être les deux seules AAA-ATPases à posséder un rôle méiotique démontré, et il a aussi été montré que la mutation *pch2* pouvait mener à une augmentation de la recombinaison sur un certain nombre de loci chez *S.cerevisiae* (ZANDERS et al. 2009).

Un premier contre-argument vient du fait qu'il existe un homologue de PCH2 chez *Arabidopsis* qui serait aussi impliqué en méiose, sa mutation semblant entraîner des défaut de synapsis et une réduction de 70% du nombre de chiasma par cellules (données non publiées, disponible sur <http://etheses.bham.ac.uk/4921>, thèse de Nuntasontorn Komsun sous la direction de Chris Franklin et Sue Armstrong). PCH2 a en effet été décrit comme perturbant les axes chromosomiques en déstabilisant la protéine HOP1 chez la levure (CHEN et al. 2014). Chez la souris, l'absence de l'homologue de PCH2, TRIP13, induit une déplétion des protéines HORMAD1 et HORMAD2, homologues à HOP1 chez cette espèce (WOJTASZ et al. 2009). Chez *Arabidopsis*, ASY1 est l'homologue de HOP1. Le marquage ASY1, utilisé comme contre-marquage de ZYP1 (voir Résultats 3, Figure 3) n'est pas altéré chez *figl1* par rapport au sauvage, indiquant que les axes chromosomiques ne semblent pas être modifiés en absence de FIGL1. L'ensemble de ces données nous poussent à croire que FIGL1 et PCH2 seraient toutes les deux requises en méiose chez *Arabidopsis*, l'une pour limiter la formation des CO, la deuxième probablement pour réguler le synapsis.

1.3.5 Le biais sur l'homologue ou le biais sur la sœur ?

Nos résultats défendent un modèle où FIGL1 pourrait limiter la formation des CO en limitant l'accès au chromosome homologue pour la réparation des cassures double-brin. FIGL1 serait donc impliquée dans ce choix de la matrice de réparation, communément appelé biais sur l'homologue.

La notion de biais est débattue. En se maintenant au niveau des observations, il est clair que : (i) en mitose, les CO sur l'homologue sont limités (RICHARDSON et al. 1998) ; (ii) en méiose, les CO sur l'homologue sont nécessaires, dans une grande majorité des espèces, à la disjonction des chromosomes homologues. Il existe donc une régulation du choix de la matrice de réparation, et ce choix est modulé différemment en mitose et en méiose. Quels sont les déterminants communs et spécifiques de chaque type de division ? Les cohésines sont mises en place au moment de la réplication en mitose comme en méiose, la seule différence étant que la protéine REC8 est spécifiquement chargée en méiose (NASMYTH et al. 2009). La grande spécificité de la méiose est la mise en place des axes chromosomiques et du complexe synaptonémal, ainsi que l'expression spécifique de protéines telles que DMC1, RAD51 et leurs protéines accessoires (HED1, MEK1 notamment). Il est donc attrayant de penser que les cohésines, dont le rôle est de garder les chromatides sœurs ensemble et qui sont présentes à la fois en méiose et en mitose, promeuvent un biais de réparation vers la sœur ; alors que les protéines de l'axe, du complexe synaptonémal et les recombinaisons méiotiques pourraient promouvoir un biais vers l'homologue. Des données chez la levure viennent appuyer cette hypothèse : les protéines MEK1 et RED1 sont nécessaires pour établir un biais vers l'homologue en méiose chez le sauvage, mais pas chez le mutant *rec8* (KIM et al. 2010). MEK1 est une kinase qui régule négativement l'activité d'échange de brin de RAD51 (HOLLINGSWORTH et al. 1997 ; NIU et al. 2005 ; THOMPSON et al. 1999) et RED1 est une protéine de l'axe chez *S.cerevisiae* (voir 2.2 page 35). Ces données tendent à montrer qu'en absence de REC8, les protéines MEK1 et RED1 sont superflues pour assurer le biais, et que donc le biais vers l'homologue serait préétabli par défaut. Ce biais par défaut serait contré par REC8 (ou les autres cohésines en mitose) pour promouvoir un biais vers la sœur. L'effet de REC8 serait alors lui-même contrecarré par MEK1 et RED1. Ces forces sont à l'œuvre pour la mise en place du biais, mais pas pour sa maintenance au moment de la transition SEI-dHj (KIM et al. 2010). Cette maintenance serait promue par DMC1, RAD51 et HED1.

Que pourrait faire FIGL1 dans ce cadre ? FIGL1 permettrait un nouveau niveau de régulation de ce biais, en contrecarrant probablement l'effet des recombinaisons. En résumé, les cohésines promouvraient un biais vers la sœur, contrecarré par des protéines régulatrices des recombinaisons, dont MEK1 (et peut-être SDS et une kinase associée in-

connue chez *Arabidopsis*?), ainsi que les protéines de l'axe telles que RED1 (et peut-être ASY3/ASY4 chez *Arabidopsis*?). Les recombinaises activées promouvraient donc un retour du biais sur l'homologue, mais pourraient être déstabilisées par FIGL1 qui renverrait la réparation vers la chromatide sœur.

L'ensemble de ces données montre que l'événement d'invasion simple brin est extrêmement contrôlé : c'est une étape dynamique soumise à de multiples régulations, qui participent sans doute à un équilibre de type homéostasie avec boucles de rétrocontrôle.

1.4 D'autres cribles possibles ?

Au cours de nos cribles, 29 allèles de *fancm*, 14 allèles de *figl1* et 3 allèles de *mhf2* ont été trouvés, mais aucun allèle de *mhf1* n'a jamais été isolé (aucun des 17 mutants non identifiés ne porte de mutation dans le gène *MHF1*, voir Table II, page 91). Pourquoi une telle variation dans le nombre de mutations trouvées ? Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. La première est que les gènes *FIGL1* et *FANCM* sont longs voire très longs (4kb et 7kb respectivement) et comportent beaucoup d'introns/exons (13 exons chacun), alors que les gènes *MHF1* et *MHF2* sont très courts (moins de 1kb) et sont composés de 4 et 8 exons respectivement. Le nombre de changements d'acides aminés et de sites d'épissage affectant l'activité de la protéine est donc bien moindre chez les MHF que chez FANCM ou FIGL1. De plus, c'est l'activité biochimique de FANCM et de FIGL1 qui est cruciale pour leur rôle anti-CO : la totalité des mutations identifiées dans *FANCM* sont situées dans le domaine hélicase de la protéine, et la très grande majorité des mutations identifiées dans *FIGL1* touchent le domaine AAA-ATPase. Les sites catalytiques des enzymes sont beaucoup plus sensibles aux changements d'acide aminés que les protéines de structures, ce que sont probablement *MHF1* et *MHF2*. Cela pourrait expliquer le peu de mutations identifiées dans *MHF2*. Le fait que nous ayons trouvé trois allèles de *mhf2* mais aucun allèle de *mhf1* est probablement le fruit du hasard, et montre que nos cribles ne sont pas encore arrivés à saturation.

Jusqu'ici nos cribles n'ont identifié que des protéines anti-CO de voie II. Nos cribles étant basés sur la suppression des mutants *zmm*, il est possible que ce soit une limitation pour trouver dans anti-CO de voie I, même s'il serait théoriquement possible de trouver des protéines anti-CO limitant à la fois la voie I et la voie II chez le sauvage. Nous n'avons pas non plus trouvé de mutant supprimant spécifiquement un mutant *zmm* sans supprimer les autres. Pourtant les protéines ZMM ont des fonctions très diverses, certaines ayant un rôle structural (protection des dHj pour MHS4 et MSH5 par exemple), d'autres

ayant plutôt des rôles régulateurs : HEI10 est une E3 ligase (QIAO et al. 2014), et les protéines ZIP2/ZIP3/ZIP4 formeraient aussi un complexe E3 ligase (PERRY et al. 2005). Il aurait donc été envisageable de trouver des supprimeurs spécifique de *zip4* et *hei10*, qui pourraient contrecarrer spécifiquement l'action de ces protéines.

D'autres cribles peuvent être intéressants à mettre en place. Afin de trouver des régulateurs de la voie I, il pourrait être envisageable de cribler contre un mutant dont la protéine est impliquée en amont du choix voie I vs voie II. La difficulté est de trouver des mutants suffisamment peu fertiles pour pouvoir cribler facilement, mais qui fournissent quand même un nombre de graines suffisant pour effectuer le crible. Un crible contre des mutants comme *sds* pourraient être en cela très intéressant. Un crible contre un mutant hypomorphes de *spo11* pourrait aussi révéler plusieurs types de supprimeurs : ceux avec un niveau de cassures rétabli ou ceux qui jouent sur l'homéostasie des CO en jouant sur le ratio CO/DSB. Le développement des technologie de type CRISPR/Cas (CONG et al. 2013) pourrait être une bonne stratégie pour pouvoir muter ponctuellement et spécifiquement la copie endogène de *SPO11*.

1.5 Pourquoi le nombre de crossovers serait-il limité ?

Les effets positifs du sexe et de la recombinaison ont été discutés en Introduction (1.3). La recombinaison permet notamment de créer de nouvelles combinaisons d'allèles sur lesquelles la sélection peut jouer. Mais y a t-il un avantage à faire beaucoup de crossovers, ou au contraire, y a t-il un désavantage à faire trop de crossovers ? Si le paradoxe du sexe est au cœur de nombreuses controverses, la question de la limitation du nombre de CO par chromosome n'est que rarement abordée par les biologistes de l'évolution. Le taux de recombinaison est un trait quantitatif soumis à variation, et de fait est soumis à sélection (MAYNARD-SMITH 1998). Le fait que le nombre de CO par chromosome soit très proche de 1 chez de nombreuses espèces (Figure 3.1, page 53) tend à démontrer qu'avoir peu de CO est évolutivement sélectionné à l'échelle de l'histoire évolutive des espèces. Le fait que l'interférence, qui est un moyen de limiter l'occurrence des CO, soit un phénomène aussi répandu à l'échelle de l'arbre des espèces argumente aussi en faveur d'un effet bénéfique de la régulation des CO.

Des hypothèses mécaniques ont été formulées pour tenter d'expliquer la pression de sélection contre un nombre élevé de CO par chromosome. Il a notamment été proposé que des CO trop proches les uns des autres pouvaient interférer avec le maintien de la cohésion et perturber la ségrégation des chromosomes (NILSSON et al. 1995 ; VEEN et al. 2003). Un contre argument vient de *S.pombe* qui possède une grande densité en CO (notamment

avec 18 CO sur un chromosome de 5,6Mb) et qui ségrège parfaitement ses chromosomes. Un autre vient de nos résultats : le double mutant *figl1 fancm* présente 5 fois plus de crossovers par méiose, et la méiose se déroule parfaitement bien. S'il est encore possible que nous n'ayons pas atteint la limite physique en augmentant par 2 ou 3 la fréquence de CO par méiose, l'exemple de *S.pombe* nous montre que la densité peut sans doute être élevée bien plus haut, et que l'effet mécanique ne serait pas une pression évolutive forte permettant de maintenir un si petit nombre de CO par chromosome dans de si nombreuses espèces.

Un effet mutateur des événements de recombinaison a aussi été avancé pour tenter d'expliquer un effet délétère de la recombinaison, notamment par l'activité de la machinerie de réparation des mésappariements : trop de recombinaison implique une réparation des mésappariements plus importante, donc à plus de substitutions de bases et à l'apparitions de plus de mutations (FRIEDBERG et al. 1995). Mais comme certains auteurs l'ont fait remarqué à juste titre, les CO ne seraient pas le vecteur principal de mutation. En effet, les CO ne sont pas toujours le produit majoritaire de la recombinaison homologue méiotique. Chez la souris par exemple, 90% des événements de recombinaison se traduisent par des NCO (COLE et al. 2012a). Si ces événements ont un effet très ponctuel sur le génome (notamment dû au fait que leur piste de conversion soit courte), ils auraient un effet mutateur deux fois supérieur à celui des CO (COLE et al. 2012b).

Une dernière hypothèse est que trop de recombinaison est désavantageux sur une échelle de temps plus longue. Les CO mélangent et réarrangent les combinaisons d'allèles dans les descendants. Un gène qui augmenterait le nombre de CO serait donc bénéfique non pas pour l'individu qui le porte, mais pour sa descendance. Dans ce cas, un tel gène ne serait sélectionné qu'indirectement, et profiterait de la meilleure fitness des descendants pour se propager. C'est ce qu'on appelle le *hitchiking*, le fait qu'un gène se fasse "prendre en stop" par un génome, sans intérêt apparent pour le génome. Des pressions de sélection importantes sur les descendants pourraient favoriser l'émergence d'un tel gène. Il a notamment été montré que les pressions de sélection sur des caractères non méiotiques peuvent jouer sur les taux de recombinaison. Deux études s'intéressant au niveau de chiasma par chromosome chez un grand nombre d'espèces de mammifères et plantes cultivées, ont mis en évidence que la domestication (qui est une pression de sélection forte) aurait tendance à augmenter le niveau de chiasma par rapport aux espèces cousines non domestiquées (BURT et al. 1987; ROSS IBARRA 2004). Les pressions de sélection auraient donc tendance à favoriser la formation des CO ; augmenter la fréquence de CO serait donc une réponse adaptative.

Comment expliquer alors si peu de recombinaison dans un si grand nombre d'espèce ? Trop de recombinaison peut aussi casser les bonnes associations d'allèles : c'est le fardeau

de la recombinaison. Il a été démontré chez la drosophile que des individus portant des chromosomes recombinés possédaient une valeur sélective moindre que les individus portant des chromosomes non recombinés (CHARLESWORTH et al. 1975). La recombinaison implique donc une baisse de fitness dans ce cas là. Ce coût de la recombinaison est aussi bien illustré par des études qui montrent que, chez de nombreuses espèces, les gènes présentant des profils d'expression similaires sont présents en clusters dans les génomes (PÁL et al. 2003). Ce clustering physique peut s'expliquer par une facilité d'accès aux gènes nécessaires aux même phénomènes (pour le facteur de transcription par exemple), mais pourrait aussi démontrer un clustering génétique : ces gènes auraient ainsi plus de chance de rester ensemble lors de la méiose. Ceci a d'ailleurs été démontré chez la levure : les gènes de ménage essentiels à la vie de la cellule sont présents en clusters sur le génome, et ce au sein de régions montrant des taux de recombinaison faibles (PÁL et al. 2003). Ce résultat suggère qu'il existe une coévolution entre la position des gènes sur le génome et la fréquence de recombinaison le long des chromosomes. Cela montre aussi que le fardeau de recombinaison peut être très lourd et que des mécanismes ont été développés pour contrer ce coût.

L'effet du fardeau de recombinaison est donc très différent si l'on parle de gènes dont l'association est bénéfique ou délétère pour l'hôte. Si les associations d'allèles sont bénéfiques, l'augmentation du taux de recombinaison permet d'associer ces allèles ensemble. Si les associations entre allèles sont délétères (ou si une combinaison donne une bien meilleure valeur sélective que toutes les autres), trop de recombinaison est dommageable. Il est donc fort probable que la fréquence de CO soit le résultat d'une balance entre des forces évolutives contradictoires. Il faut ajouter à cela une autre condition : le crossover obligatoire. Pour les espèces dont la ségrégation des chromosomes dépend des CO, il est absolument indispensable de garantir le CO obligatoire pour assurer une reproduction efficace. Il est donc envisageable que l'optimum de fréquence de recombinaison soit inférieur à 1 CO par chromosome pour des raisons génétiques et évolutives, mais que le CO obligatoire impose un minimum de 1 CO par chromosome.

Les mutants hyper-recombinants sont aujourd'hui de formidables outils pour aborder ces questions. Des approches sur le long terme d'étude de l'adaptabilité ou de l'acquisition de nouvelles fonctions comme cela a été réalisé chez *E. coli* (BLOUNT et al. 2012) pourraient mettre en évidence s'il existe, ou non, des pressions évolutives pour une limitation du nombre de crossovers à l'échelle de l'évolution.

Bibliographie

Bibliographie

- ACQUAVIVA, L et al. (jan. 2013). « The COMPASS Subunit Spp1 Links Histone Methylation to Initiation of Meiotic Recombination ». English. Dans : *Science* **339.6116**, page(s): 215–218.
- ADAMO, A. et al. (juil. 2010). « Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia ». Dans : *Molecular Cell* **39.1**, page(s): 25–35.
- AGARWAL, S et G. S. ROEDER (juil. 2000). « Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. » English. Dans : *Cell* **102.2**, page(s): 245–255.
- AGOSTINHO, A. et al. (juil. 2013). « Combinatorial Regulation of Meiotic Holliday Junction Resolution in *C. elegans* by HIM-6 (BLM) Helicase, SLX-4, and the SLX-1, MUS-81 and XPF-1 Nucleases ». English. Dans : *PLoS genetics* **9.7**, page(s): e1003591.
- ALANI, E., R. PADMORE et N. KLECKNER (1990). « Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination ». Dans : *Cell* **61.3**, page(s): 419–436.
- ALI, A. M. et al. (avr. 2012). « FAAP20 : a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway ». English. Dans : *Blood* **119.14**, page(s): 3285–3294.
- ALLERS, T. et M. LICHTEN (juil. 2001). « Differential Timing and Control of Noncrossover and Crossover Recombination during Meiosis ». English. Dans : *Cell* **106.1**, page(s): 47–57.
- ALPI, A., P. PASIERBEK, A. GARTNER et J. LOIDL (juil. 2003). « Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans* ». Dans : *Chromosoma* **112.1**, page(s): 6–16.
- AMMELBURG, M., T. FRICKEY et A. N. LUPAS (oct. 2006). « Classification of AAA+ proteins ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **156.1**, page(s): 2–11.
- ANDERSON, L. K., A REEVES, L. M. WEBB et T ASHLEY (mar. 1999). « Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. » English. Dans : *Genetics* **151.4**, page(s): 1569–1579.
- ARGUESO, J. L. (2004). « Competing Crossover Pathways Act During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* ». English. Dans : *Genetics* **168.4**, page(s): 1805–1816.

- ARMSTRONG, S. J. (sept. 2002). « Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica ». Dans : *Journal of Cell Science* **115.18**, page(s): 3645–3655.
- ARMSTRONG, S. J., F. C. H. FRANKLIN et G. H. JONES (sept. 2003). « A meiotic time-course for Arabidopsis thaliana ». Dans : *Sexual Plant Reproduction* **16.3**, page(s): 141–149.
- ARORA, C., K. KEE, S. MALEKI et S. KEENEY (fév. 2004). « Antiviral protein Ski8 is a direct partner of Spo11 in meiotic DNA break formation, independent of its cytoplasmic role in RNA metabolism. » English. Dans : *Molecular Cell* **13.4**, page(s): 549–559.
- AZMI, I et al. (jan. 2008). « ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1 ». English. Dans : *Developmental Cell* **14.1**, page(s): 50–61.
- AZUMI, Y. et al. (juin 2002). « Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. » English. Dans : *The EMBO Journal* **21.12**, page(s): 3081–3095.
- BABST, M, B WENDLAND, E. J. ESTEPA et S. D. EMR (juin 1998). « The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. » English. Dans : *The EMBO Journal* **17.11**, page(s): 2982–2993.
- BAGHERIEH-NAJJAR, M. B., O. M. H. VRIES, J. HILLE et P. P. DIJKWEL (août 2005). « Arabidopsis RecQ14A suppresses homologous recombination and modulates DNA damage responses ». English. Dans : *The Plant Journal* **43.6**, page(s): 789–798.
- BAKER, S. M. et al. (juil. 1996). « Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. » English. Dans : *Nature Genetics* **13.3**, page(s): 336–342.
- BARAKATE, A et al. (mar. 2014). « The Synaptonemal Complex Protein ZYP1 Is Required for Imposition of Meiotic Crossovers in Barley ». English. Dans : *THE PLANT CELL ONLINE* **26.2**, page(s): 729–740.
- BARBER, L. J. et al. (oct. 2008). « RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination ». Dans : *Cell* **135.2**, page(s): 261–271.
- BAUDAT, F et al. (fév. 2010). « PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice ». English. Dans : *Science* **327.5967**, page(s): 836–840.
- BAUDAT, F. et B. MASSY (août 2007). « Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis ». anglais. Dans : *Chromosome Research* **15.5**, page(s): 565–577.
- BAUDAT, F., Y. IMAI et B. de MASSY (2013). « Meiotic recombination in mammals : localization and regulation. » eng. Dans : *Nat Rev Genet* **14.11**, page(s): 794–806.

- BERCHOWITZ, L. E. et G. P. COPENHAVER (jan. 2008). « Fluorescent Arabidopsis tetrads : a visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets ». Dans : *Nature Protocols* **3.1**, page(s): 41–50.
- BERCHOWITZ, L. E., K. E. FRANCIS, A. L. BEY et G. P. COPENHAVER (2005). « The Role of AtMUS81 in Interference-Insensitive Crossovers in Arabidopsis thaliana ». English. Dans : *PLoS genetics preprint.2007*, page(s): e132.
- BERGER, J. M., S. J. GAMBLIN, S. C. HARRISON et J. C. WANG (1996). « Structure and mechanism of DNA topoisomerase II ». Dans :
- BERGERAT, A. et al. (1997). « An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination ». Dans :
- BERNSTEIN, H., C. BERNSTEIN et R. E. MICHOD (2012). « Meiosis as an evolutionary adaptation for DNA repair ». Dans : *DNA repair. InTech*. <http://www.intechopen.com/books/dna-repair/meiosis-as-an-evolutionary-adaptation-for-dna-repair>.
- BEYER, A (oct. 1997). « Sequence analysis of the AAA protein family. » anglais. Dans : *Protein science : a publication of the Protein Society* **6.10**, page(s): 2043–2058.
- BHALLA, N (déc. 2005). « A Conserved Checkpoint Monitors Meiotic Chromosome Synapsis in Caenorhabditis elegans ». English. Dans : *Science* **310.5754**, page(s): 1683–1686.
- BHALLA, N., D. J. WYNNE, V. JANTSCH et A. F. DERNBURG (oct. 2008). « ZHP-3 Acts at Crossovers to Couple Meiotic Recombination with Synaptonemal Complex Disassembly and Bivalent Formation in C. elegans ». English. Dans : *PLoS genetics* **4.10**, page(s): e1000235.
- BHATT, A. M. et al. (1999). « The DIF1 gene of Arabidopsis is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family ». Dans : *The Plant Journal* **19.4**, page(s): 463–472.
- BICHET, A, T DESNOS, S TURNER, O GRANDJEAN et H HÖFTE (jan. 2001). « BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. » English. Dans : *The Plant journal : for cell and molecular biology* **25.2**, page(s): 137–148.
- BISHOP, D. K. (déc. 1994). « RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. » English. Dans : *Cell* **79.6**, page(s): 1081–1092.
- BISHOP, D. K., D PARK, L XU et N KLECKNER (mai 1992). « DMC1 : a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. » English. Dans : *Cell* **69.3**, page(s): 439–456.

- BISHOP, D. K. et al. (août 1998). « Xrcc3 Is Required for Assembly of Rad51 Complexes in Vivo ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **273.34**, page(s): 21482–21488.
- BISHOP, D. K. (nov. 2012). « Rad51, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis ». English. Dans : *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11.22**, page(s): 4105–4106.
- BISHOP, D. K. et D. ZICKLER (mar. 2004). « Early Decision : Meiotic Crossover Review Interference prior to Stable StrandExchange and Synapsis ». anglais. Dans : *Cell* **117.1**, page(s): 9–15.
- BLAT, Y., R. U. PROTACIO, N. HUNTER et N. KLECKNER (déc. 2002). « Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. » English. Dans : *Cell* **111.6**, page(s): 791–802.
- BLEUYARD, J.-Y. et C. I. WHITE (jan. 2004). « The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. » English. Dans : *The EMBO Journal* **23.2**, page(s): 439–449.
- BLEUYARD, J.-Y., M. E. GALLEGRO, F. SAVIGNY et C. I. WHITE (fév. 2005). « Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. » English. Dans : *The Plant journal : for cell and molecular biology* **41.4**, page(s): 533–545.
- BLOUNT, Z. D., J. E. BARRICK, C. J. DAVIDSON et R. E. LENSKI (sept. 2012). « Genomic analysis of a key innovation in anexperimental Escherichia coli population ». Dans : *Nature* **488.7417**, page(s): 513–518.
- BOER, E. et C. HEYTING (mar. 2006a). « The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis ». English. Dans : *Chromosoma* **115.3**, page(s): 220–234.
- BOER, E. de, P. STAM, A. J. J. DIETRICH, A. PASTINK et C. HEYTING (juin 2006b). « Two levels of interference in mouse meiotic recombination. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103.25**, page(s): 9607–9612.
- BORDE, V. et J. COBB (juin 2009). « Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication ». English. Dans : *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41.6**, page(s): 1249–1253.
- BORDE, V. et B. de MASSY (avr. 2013). « Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis : setting up communication between DNA and the chromosome structure ». Dans : *Current Opinion in Genetics & Development* **23.2**, page(s): 147–155.
- BÖRNER, G. V., A. BAROT et N. KLECKNER (2008). « Yeast Pch2 promotes domainal axis organization, timely recombination progression, and arrest of defective recombi-

- nosomes during meiosis ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105.9**, page(s): 3327–3332.
- BÖRNER, G. et N KLECKNER (2004). « Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis 10.1016/S0092-8674(04)00292-2 : Cell | ScienceDirect.com ». Dans : *Cell*, page(s): 1–17.
- BOUQUIN, T (jan. 2003). « The Arabidopsis lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth ». Dans : *Journal of Cell Science* **116.5**, page(s): 791–801.
- BOURNE, E. C. et al. (juin 2013). « Large and variable genome size unrelated to serpentine adaptation but supportive of cryptic sexuality in *Cenococcum geophilum* ». English. Dans : *Mycorrhiza* **24.1**, page(s): 13–20.
- BRABANT, A. J. van et al. (nov. 2000). « Binding and Melting of D-Loops by the Bloom Syndrome Helicase † ». English. Dans : *Biochemistry* **39.47**, page(s): 14617–14625.
- BUARD, J. e. r. o. m., P. B. e. s, C. GREY et B. de MASSY (juil. 2009). « Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse ». Dans : **28.17**, page(s): 2616–2624.
- BUHLER, C., V. BORDE et M. LICHTEN (2007). « Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* ». Dans : *PLoS biology* **5.12**, page(s): e324.
- BURK, D. H., B LIU, R ZHONG, W. H. MORRISON et Z. H. YE (mar. 2001). « A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. » English. Dans : *The Plant Cell ...* **13.4**, page(s): 807–827.
- BURT, A (avr. 2000). « Perspective : sex, recombination, and the efficacy of selection—was Weismann right ? » English. Dans : *Evolution; international journal of organic evolution* **54.2**, page(s): 337–351.
- BURT, A. et G. BELL (1987). « Mammalian chiasma frequencies as a test of two theories of recombination ». Dans : *Nature* **326.6115**, page(s): 803–805.
- BUSYGINA, V et al. (jan. 2012). « Novel Attributes of Hed1 Affect Dynamics and Activity of the Rad51 Presynaptic Filament during Meiotic Recombination ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **287.2**, page(s): 1566–1575.
- CARPENTER, A. T. (mar. 1973). « A meiotic mutant defective in distributive disjunction in *Drosophila melanogaster*. » English. Dans : *Genetics* **73.3**, page(s): 393–428.
- CARYL, A. P., S. J. ARMSTRONG, G. H. JONES et F. C. FRANKLIN (2000). « A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the Arabidopsis meiotic mutant *asy1*. » English. Dans : *Chromosoma* **109.1-2**, page(s): 62–71.

- CASANOVA, M. et al. (mar. 2009). « Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in Trypanosomatids ». English. Dans : *Molecular Microbiology* **71.6**, page(s): 1353–1370.
- CASTILLO, V., O. CABRÉ, R. MARCOS et J. SURRALLÉS (2003). « Molecular cloning of the Drosophila Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA ». Dans : *DNA Repair* **2.6**, page(s): 751–758.
- CEJKA, P., J. L. PLANK, C. C. DOMBROWSKI et S. C. KOWALCZYKOWSKI (sept. 2012). « Decatenation of DNA by the S.cerevisiae Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA Complex : A Mechanism for Disentangling Chromosomes ». Dans : *Molecular Cell* **47.6**, page(s): 886–896.
- CHAPMAN, J. R., M. R. G. TAYLOR et S. J. BOULTON (août 2012). « Playing the End Game : DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice ». Dans : *Molecular Cell* **47.4**, page(s): 497–510.
- CHARLESWORTH, B. et D. CHARLESWORTH (1975). « An experiment on recombination load in Drosophila melanogaster ». Dans : *Genetical research* **25.03**, page(s): 267–273.
- CHELYSHEVA, L. et al. (2010). « An Easy Protocol for Studying Chromatin and Recombination Protein Dynamics during Arabidopsisthaliana Meiosis : Immunodetection of Cohesins, Histones and MLH1 ». English. Dans : *Cytogenetic and Genome Research* **129.1-3**, page(s): 143–153.
- CHELYSHEVA, L. et al. (2007). « Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in Arabidopsis thaliana ». anglais. Dans : *PLoS genetics* **3.5**, page(s): e83.
- CHELYSHEVA, L., D. VEZON, K. BELCRAM, G. GENDROT et M. GRELON (déc. 2008). « The Arabidopsis BLAP75/Rmi1 Homologue Plays Crucial Roles in Meiotic Double-Strand Break Repair ». anglais. Dans : *PLoS genetics* **4.12**, page(s): e1000309.
- CHELYSHEVA, L. et al. (juil. 2012). « The Arabidopsis HEI10 Is a New ZMM Protein Related to Zip3 ». English. Dans : *PLoS genetics* **8.7**, page(s): e1002799.
- CHEN, C., A. JOMAA, J. ORTEGA et E. E. ALANI (2014). « Pch2 is a hexameric ring ATPase that remodels the chromosome axis protein Hop1 ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111.1**, page(s): E44–E53.
- CHEN, J. et S. U. ÅSTRÖM (août 2012). « A catalytic and non-catalytic role for the Yen1 nuclease in maintaining genome integrity in Kluyveromyces lactis ». Dans : *DNA Repair*, page(s): 1–11.
- CHEN, W. et S. JINKS-ROBERTSON (avr. 1999). « The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. » English. Dans : *Genetics* **151.4**, page(s): 1299–1313.

- CHEN, Y.-K. et al. (2004). « Heterodimeric complexes of Hop2 and Mnd1 function with Dmc1 to promote meiotic homolog juxtaposition and strand assimilation ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101.29**, page(s): 10572–10577.
- CHENG, N. C. et al. (juil. 2000). « Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. » English. Dans : *Human Molecular Genetics* **9.12**, page(s): 1805–1811.
- CHI, P (juin 2006). « Yeast Recombination Factor Rdh54 Functionally Interacts with the Rad51 Recombinase and Catalyzes Rad51 Removal from DNA ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **281.36**, page(s): 26268–26279.
- CHIKASHIGE, Y. et al. (1994). « Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast ». Dans : *Science* **264.5156**, page(s): 270–273.
- CHOI, K. et al. (sept. 2013). « Arabidopsis ». Dans : *Nature Publishing Group* **45.11**, page(s): 1327–1336.
- CICCIA, A. et al. (fév. 2007). « Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein that Interacts with FANCM ». English. Dans : *Molecular Cell* **25.3**, page(s): 331–343.
- CICCIA, A., N. McDONALD et S. C. WEST (juin 2008). « Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins ». English. Dans : *Annual Review of Biochemistry* **77.1**, page(s): 259–287.
- CLARK-MAGUIRE, S. et P. E. MAINS (1994). « mei-1, a gene required for meiotic spindle formation in *Caenorhabditis elegans*, is a member of a family of ATPases. » Dans : *Genetics* **136.2**, page(s): 533–546.
- CLOUD, V, Y. L. CHAN, J GRUBB, B BUDKE et D. K. BISHOP (sept. 2012). « Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation During Meiosis ». English. Dans : *Science* **337.6099**, page(s): 1222–1225.
- COLE, F. et al. (mar. 2012a). « Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis ». Dans : *Nature cell biology* **14.3**, page(s): 1–8.
- COLE, F., S. KEENEY et M. JASIN (sept. 2012b). « Preaching about the converted : how meiotic gene conversion influences genomic diversity ». English. Dans : *Annals of the New York Academy of Sciences* **1267.1**, page(s): 95–102.
- COLLIS, S. J., L. J. BARBER, J. D. WARD, J. S. MARTIN et S. J. BOULTON (nov. 2006). « *C. elegans* FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair ». English. Dans : *DNA Repair* **5.11**, page(s): 1398–1406.
- COLLIS, S. J. et al. (nov. 2008). « FANCM and FAAP24 Function in ATR-Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex ». Dans : *Molecular Cell* **32.3**, page(s): 313–324.

- CONG, L et al. (fév. 2013). « Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems ». English. Dans : *Science* **339.6121**, page(s): 819–823.
- COOPER, A. et al. (2008). « Genetic analysis of the human infective trypanosome *Trypanosoma brucei gambiense* : chromosomal segregation, crossing over, and the construction of a genetic map ». English. Dans : *Genome Biology* **9.6**, page(s): R103.
- COUTEAU, F et al. (sept. 1999). « Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. » anglais. Dans : *The Plant Cell* ... **11.9**, page(s): 1623–1634.
- COUTEAU, F., K. NABESHIMA, A. VILLENEUVE et M. ZETKA (avr. 2004). « A Component of *C. elegans* Meiotic Chromosome Axes at the Interface of Homolog Alignment, Synapsis, Nuclear Reorganization, and Recombination ». English. Dans : *Current Biology* **14.7**, page(s): 585–592.
- COX, A et al. (août 2009). « A New Standard Genetic Map for the Laboratory Mouse ». English. Dans : *Genetics* **182.4**, page(s): 1335–1344.
- COX, G. A., C. L. MAHAFFEY, A NYSTUEN, V. A. LETTS et W. N. FRANKEL (oct. 2000). « The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. » English. Dans : *Nature Genetics* **26.2**, page(s): 198–202.
- CRISMANI, W. et al. (juin 2012). « FANCM limits meiotic crossovers. » English. Dans : *Science* **336.6088**, page(s): 1588–1590.
- CRISMANI, W. et al. (jan. 2013). « MCM8 Is Required for a Pathway of Meiotic Double-Strand Break Repair Independent of DMC1 in *Arabidopsis thaliana* ». Dans : *PLoS genetics* **9.1**, page(s): e1003165.
- CROMER, L. et al. (nov. 2013). « Centromeric Cohesion Is Protected Twice at Meiosis, by SHUGOSHINS at Anaphase I and by PATRONUS at Interkinesis ». Dans : *Current biology : CB* **23.21**, page(s): 2090–2099.
- DA INES, O. et al. (avr. 2013). « Effects of XRCC2 and RAD51B mutations on somatic and meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana* ». English. Dans : *The Plant Journal* **74.6**, page(s): 959–970.
- DANGEL, N. J., A. KNOLL et H. PUCHTA (mai 2014). « MHF1 plays Fanconi anaemia complementation group M protein (FANCM)-dependent and FANCM-independent roles in DNA repair and homologous recombination in plants ». English. Dans : *The Plant Journal* **78.5**, page(s): 822–833.
- DANILOWICZ, C et al. (fév. 2012). « RecA homology search is promoted by mechanical stress along the scanned duplex DNA ». English. Dans : *Nucleic Acids Research* **40.4**, page(s): 1717–1727.

- DANILOWICZ, C. et al. (jan. 2014). « The differential extension in dsDNA bound to Rad51 filaments may play important roles in homology recognition and strand exchange. » English. Dans : *Nucleic Acids Research* **42.1**, page(s): 526–533.
- DAWKINS, R. (2006). *The Selfish Gene : 30th Anniversary edition : 30th Anniversary edition*. OUP Oxford.
- DAWSON, D. S., A. W. MURRAY et J. W. SZOSTAK (nov. 1986). « An alternative pathway for meiotic chromosome segregation in yeast. » English. Dans : *Science* **234.4777**, page(s): 713–717.
- DE MUYT, A. et al. (sept. 2007). « AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana*. » English. Dans : *The EMBO Journal* **26.18**, page(s): 4126–4137.
- DE MUYT, A. et al. (sept. 2009). « A High Throughput Genetic Screen Identifies New Early Meiotic Recombination Functions in *Arabidopsis thaliana* ». anglais. Dans : *PLoS genetics* **5.9**, page(s): e1000654.
- DE MUYT, A. et al. (avr. 2012). « BLM Helicase Ortholog Sgs1 Is a Central Regulator of Meiotic Recombination Intermediate Metabolism ». Dans : *Molecular Cell* **46.1**, page(s): 43–53.
- DE MUYT, A. et al. (mai 2014). « E3 ligase Hei10 : a multifaceted structure-based signaling molecule with roles within and beyond meiosis ». English. Dans : *Genes & Development* **28.10**, page(s): 1111–1123.
- DERNBURG, A. F., J. W. SEDAT et R. S. HAWLEY (juil. 1996). « Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. » English. Dans : *Cell* **86.1**, page(s): 135–146.
- DERNBURG, A., K MCDONALD, G MOULDER et R BARSTEAD (juil. 1998). « Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis ». Dans : *Cell*, page(s): 1–12.
- DING, H. et al. (juin 2004). « Regulation of Murine Telomere Length by Rtel ». anglais. Dans : *Cell* **117.7**, page(s): 873–886.
- DING, X. et al. (2007). « SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. » eng. Dans : *Dev Cell* **12.6**, page(s): 863–872.
- DOUTRIAUX, M. P., F COUTEAU, C BERGOUNIOUX et C WHITE (fév. 1998). « Isolation and characterisation of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*. » English. Dans : *Molecular & general genetics : MGG* **257.3**, page(s): 283–291.
- DROUAUD, J. et al. (nov. 2013). « Contrasted Patterns of Crossover and Non-crossover at *Arabidopsis thaliana* Meiotic Recombination Hotspots ». English. Dans : *PLoS genetics* **9.11**, page(s): e1003922.

- DUPAIGNE, P. et al. (2008). « The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA : implications for crossover incidence during mitotic recombination ». Dans : *Molecular cell* **29.2**, page(s): 243–254.
- DUROC, Y., L. CHELYSHEVA, A. LEMHEMDI, L. CROMER et R. MERCIER. « PSS1 (article en cours de révision) ». Dans : *PLoS genetics*.
- DURRANT, W. E., S. WANG et X. DONG (2007). « Arabidopsis SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104.10**, page(s): 4223–4227.
- ERDMANN, R et al. (fév. 1991). « PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. » English. Dans : *Cell* **64.3**, page(s): 499–510.
- EVANS, D. H., Y. F. LI, M. E. FOX et G. R. SMITH (1997). « A WD repeat protein, Rec14, essential for meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe* ». Dans : *Genetics* **146.4**, page(s): 1253–1264.
- FALQUE, M, R. MERCIER, C. MEZARD, D. de VIENNE et O. C. MARTIN (mai 2007). « Patterns of Recombination and MLH1 Foci Density Along Mouse Chromosomes : Modeling Effects of Interference and Obligate Chiasma ». English. Dans : *Genetics* **176.3**, page(s): 1453–1467.
- FALQUE, M, L. K. ANDERSON, S. M. STACK, F. GAUTHIER et O. C. MARTIN (jan. 2010). « Two Types of Meiotic Crossovers Coexist in Maize ». English. Dans : *THE PLANT CELL ONLINE* **21.12**, page(s): 3915–3925.
- FARKHARI, M. et al. (avr. 2011). « Recombination frequency variation in maize as revealed by genome-wide single-nucleotide polymorphisms ». English. Dans : *Plant Breeding* **130.5**, page(s): 533–539.
- FARR, G. W. et al. (2000). « Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL ». Dans : *Cell* **100.5**, page(s): 561–573.
- FEKAIRI, S. et al. (juil. 2009). « Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases ». Dans : *Cell* **138.1**, page(s): 78–89.
- FERDOUS, M. et al. (fév. 2012). « Inter-Homolog Crossing-Over and Synapsis in Arabidopsis Meiosis Are Dependent on the Chromosome Axis Protein AtASY3 ». English. Dans : *PLoS genetics* **8.2**, page(s): e1002507.
- FERRARI, S. R., J. GRUBB et D. K. BISHOP (avr. 2009). « The Mei5-Sae3 Protein Complex Mediates Dmc1 Activity in *Saccharomyces cerevisiae* ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **284.18**, page(s): 11766–11770.

- FINKEN-EIGEN, M, R. A. RÖHRICHT et K KÖHRER (juin 1997). « The VPS4 gene is involved in protein transport out of a yeast pre-vacuolar endosome-like compartment. » English. Dans : *Current Genetics* **31.6**, page(s): 469–480.
- FLOT, J.-F. et al. (juil. 2013). « Genomic evidence for ameiotic evolution in thebdelloid rotifer *Adineta vaga* ». Dans : *Nature* **500.7463**, page(s): 453–457.
- FOSS, E. J. et F. W. STAHL (mar. 1995). « A test of a counting model for chiasma interference. » English. Dans : *Genetics* **139.3**, page(s): 1201–1209.
- FOX, D. (1973). « The control of chiasma distribution in the locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål) ». Dans : *Chromosoma* **43.3**, page(s): 289–328.
- FRICKEY, T. et A. N. LUPAS (avr. 2004). « Phylogenetic analysis of AAA proteins ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **146.1-2**, page(s): 2–10.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER, W. SIEDE et al. (1995). *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology (ASM).
- GAME, J. C. et R. K. MORTIMER (sept. 1974). « A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. » English. Dans : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **24.3**, page(s): 281–292.
- GARCIA-HIGUERA, I et al. (fév. 2001). « Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. » English. Dans : *Molecular Cell* **7.2**, page(s): 249–262.
- GARI, K., C. DECAILLET, A. Z. STASIAK, A. STASIAK et A. CONSTANTINO (jan. 2008). « The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks ». English. Dans : *Molecular Cell* **29.1**, page(s): 141–148.
- GASSNER, G. (1969). « Synaptonemal complexes in the achiasmatic spermatogenesis of *Bolbe nigra* Giglio-Tos (Mantoidea) ». Dans : *Chromosoma* **26.1**, page(s): 22–34.
- GIRARD, C. et al. (2014). « FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers ». Dans : *Nucleic Acids Research*.
- GIRAUT, L. et al. (nov. 2011). « Genome-Wide Crossover Distribution in *Arabidopsis thaliana* Meiosis Reveals Sex-Specific Patterns along Chromosomes ». anglais. Dans : *PLoS genetics* **7.11**, page(s): e1002354.
- GRANDONT, L, E JENCZEWSKI et A LLOYD (2013). « Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants ». English. Dans : *Cytogenetic and Genome Research*.
- GREEN, D. et C. MASON (août 2013). « The maintenance of sex : Ronald Fisher meets the Red Queen ». Dans : *BMC Evolutionary Biology* **13.1**, page(s): 1–1.
- GRELON, M, D VEZON et G GENDROT (2001). « AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants ». Dans : *The EMBO Journal*.

- GREY, C. et al. (oct. 2011). « Mouse PRDM9 DNA-Binding Specificity Determines Sites of Histone H3 Lysine 4 Trimethylation for Initiation of Meiotic Recombination ». English. Dans : *PLoS biology* **9.10**, page(s): e1001176.
- GRIFFITHS, S. et al. (fév. 2006). « Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat ». Dans : *Nature cell biology* **439.7077**, page(s): 749–752.
- GRÜNEBERG, H. (1943). « Two new mutant genes in the house mouse ». Dans : *Journal of Genetics* **45.1**, page(s): 22–28.
- GUACCI, V et D. B. KABACK (mar. 1991). « Distributive disjunction of authentic chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. » English. Dans : *Genetics* **127.3**, page(s): 475–488.
- GUILLON, H. et B. de MASSY (sept. 2002). « An initiation site for meiotic crossing-over and gene conversion in the mouse ». Dans : *Nature Genetics* **32.2**, page(s): 296–299.
- GUIRALDELLI, M. F., C. EYSTER, J. L. WILKERSON, M. E. DRESSER et R. J. PEZZA (2013). « Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis ». Dans : *PLoS genetics* **9.3**, page(s): e1003383.
- GUO, M, V VIDHYASAGAR, H DING et Y WU (avr. 2014). « Insight into the Roles of Helicase Motif Ia by Characterizing Fanconi Anemia Group J Protein (FANCI) Patient Mutations ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **289.15**, page(s): 10551–10565.
- HABER, J. E. (2000). « Partners and pathways : repairing a double-strand break ». Dans : *Trends in Genetics* **16.6**, page(s): 259–264.
- HABU, T, T TAKI, A WEST, Y NISHIMUNE et T MORITA (fév. 1996). « The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. » English. Dans : *Nucleic Acids Research* **24.3**, page(s): 470–477.
- HALDANE, J. (1919). « THE COMBINATION OF LINKAGE VALUES, AND THE OBTAINING OF DISTANCES BETWEEN THE LOCI OF LINKED FACTORS. » Dans :
- HARPER, L (août 2004). « A bouquet of chromosomes ». anglais. Dans : *Journal of Cell Science* **117.18**, page(s): 4025–4032.
- HARTMAN, J. J. et R. D. VALE (oct. 1999). « Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. » English. Dans : *Science* **286.5440**, page(s): 782–785.

- HARTUNG, F et S SUER (2007). « Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana* ». Dans : *Proceedings of the National ...*
- HAUF, S. et Y. WATANABE (2004). « Kinetochore orientation in mitosis and meiosis ». Dans : *Cell* **119.3**, page(s): 317–327.
- HAWLEY, S. R. et W. E. THEURKAUF (1993). « Requiem for distributive segregation : achiasmate segregation in *Drosophila* females ». Dans : *Trends in Genetics* **9.9**, page(s): 310–316.
- HAZAN, J et al. (nov. 1999). « Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. » English. Dans : *Nature Genetics* **23.3**, page(s): 296–303.
- HERSKOWITZ, I (déc. 1988). « Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. » English. Dans : *Microbiological reviews* **52.4**, page(s): 536–553.
- HIGGINS, J. D., S. J. ARMSTRONG, F. C. H. FRANKLIN et G. H. JONES (oct. 2004). « The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination : evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. » anglais. Dans : *Genes & Development* **18.20**, page(s): 2557–2570.
- HIGGINS, J. D., E. SANCHEZ-MORAN, S. J. ARMSTRONG, G. H. JONES et F. C. H. FRANKLIN (oct. 2005). « The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. » English. Dans : *Genes & Development* **19.20**, page(s): 2488–2500.
- HIGGINS, J. D. et al. (juil. 2008). « AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in *Arabidopsis thaliana*, but is not required for synapsis ». anglais. Dans : *The Plant Journal* **55.1**, page(s): 28–39.
- HILL, W. G. et A ROBERTSON (juin 1968). « Linkage disequilibrium in finite populations. » English. Dans : *TAG Theoretical and Applied Genetics* **38.6**, page(s): 226–231.
- HILLERS, K. J. et A. M. VILLENEUVE (sept. 2003). « Chromosome-Wide Control of Meiotic Crossing over in *C. elegans* ». anglais. Dans : *Current Biology* **13.18**, page(s): 1641–1647.
- HIRAOKA, Y. et A. F. DERNBURG (nov. 2009). « The SUN Rises on Meiotic Chromosome Dynamics ». Dans : *Developmental Cell* **17.5**, page(s): 598–605.
- HOFFMANN, E. R. et R. H. BORTS (2004). « Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins ». English. Dans : *Cytogenetic and Genome Research* **107.3-4**, page(s): 232–248.

- HOLLINGSWORTH, N. M. (jan. 2004). « The Mus81 solution to resolution : generating meiotic crossovers without Holliday junctions ». English. Dans : *Genes & Development* **18.2**, page(s): 117–125.
- HOLLINGSWORTH, N. M. et B BYERS (mar. 1989). « HOP1 : a yeast meiotic pairing gene. » English. Dans : *Genetics* **121.3**, page(s): 445–462.
- HOLLINGSWORTH, N. M., L PONTE et C HALSEY (juil. 1995). « MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. » English. Dans : *Genes & Development* **9.14**, page(s): 1728–1739.
- HOLLINGSWORTH, N. M. et L. PONTE (1997). « Genetic interactions between HOP1, RED1 and MEK1 suggest that MEK1 regulates assembly of axial element components during meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ». Dans : *Genetics* **147.1**, page(s): 33–42.
- HONG, S. et al. (août 2013). « The Logic and Mechanism of Homologous Recombination Partner Choice ». Dans : *Molecular Cell* **51.4**, page(s): 440–453.
- HOWARD-FLANDERS, P, S. C. WEST et A STASIAK (mai 1984). « Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. » English. Dans : *Nature* **309.5965**, page(s): 215–219.
- HUNTER, N et R. H. BORTS (juin 1997). « Mlh1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to promote crossing-over during meiosis. » anglais. Dans : *Genes & Development* **11.12**, page(s): 1573–1582.
- HUNTER, N. et N. KLECKNER (2001). « The single-end invasion : an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination ». Dans : *Cell* **106.1**, page(s): 59–70.
- HYPBA, R. W. et G. R. SMITH (juil. 2010). « Crossover Invariance Determined by Partner Choice for Meiotic DNA Break Repair ». Dans : *Cell* **142.2**, page(s): 243–255.
- IP, S. C. et al. (2008). « Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast ». Dans : *Nature* **456.7220**, page(s): 357–361.
- IRA, G., A. MALKOVA, G. LIBERI, M. FOIANI et J. E. HABER (nov. 2003). « Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. » English. Dans : *Cell* **115.4**, page(s): 401–411.
- IYER, L. M., D. D. LEIPE, E. V. KOONIN et L ARAVIND (avr. 2004). « Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **146.1-2**, page(s): 11–31.
- JACKSON, N. et al. (mar. 2006). « Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in AtMLH3-deficient Arabidopsis. » English. Dans : *The EMBO Journal* **25.6**, page(s): 1315–1323.

- JENSEN-SEAMAN, M. I. (avr. 2004). « Comparative Recombination Rates in the Rat, Mouse, and Human Genomes ». English. Dans : *Genome Research* **14.4**, page(s): 528–538.
- JESSOP, L. et M. LICHTEN (août 2008). « Mus81/Mms4 Endonuclease and Sgs1 Helicase Collaborate to Ensure Proper Recombination Intermediate Metabolism during Meiosis ». English. Dans : *Molecular Cell* **31.3**, page(s): 313–323.
- JINKS-ROBERTSON, S et T. D. PETES (nov. 1986). « Chromosomal translocations generated by high-frequency meiotic recombination between repeated yeast genes. » English. Dans : *Genetics* **114.3**, page(s): 731–752.
- JOENJE, H et al. (oct. 1997). « Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. » English. Dans : *American journal of human genetics* **61.4**, page(s): 940–944.
- JOENJE, H et K. J. PATEL (juin 2001). « The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. » anglais. Dans : *Nature Reviews Genetics* **2.6**, page(s): 446–457.
- JOHNSON, A (fév. 2003). « Ordered ATP Hydrolysis in the gamma Complex Clamp Loader AAA+ Machine ». Dans : *Journal of Biological Chemistry* **278.16**, page(s): 14406–14413.
- JOLIVET, S., D. VEZON, N. FROGER et R. MERCIER (juin 2006). « Non conservation of the meiotic function of the Ski8/Rec103 homolog in Arabidopsis ». anglais. Dans : *Genes to Cells* **11.6**, page(s): 615–622.
- JOSHI, N., A. BAROT, C. JAMISON et G. V. BÖRNER (juil. 2009). « Pch2 Links Chromosome Axis Remodeling at Future Crossover Sites and Crossover Distribution during Yeast Meiosis ». anglais. Dans : *PLoS genetics* **5.7**, page(s): e1000557.
- KADYK, L. C. et L. H. HARTWELL (1992). « Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. » Dans : *Genetics* **132.2**, page(s): 387–402.
- KARATA, K., T. INAGAWA, A. J. WILKINSON, T. TATSUTA et T. OGURA (1999). « Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH ». Dans : *The Journal of biological chemistry* **274.37**, page(s): 26225–26232.
- KASS, E. M. et M. JASIN (sept. 2010). « Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways ». Dans : *FEBS LETTERS* **584.17**, page(s): 3703–3708.
- KAUPPI, L et al. (avr. 2013). « Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis ». English. Dans : *Genes & Development* **27.8**, page(s): 873–886.

- KEE, Y et A. D. D'ANDREA (août 2010). « Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability ». English. Dans : *Genes & Development* **24.16**, page(s): 1680–1694.
- KEELAGHER, R. E., V. E. COTTON, A. S. H. GOLDMAN et R. H. BORTS (fév. 2011). « Separable roles for Exonuclease I in meiotic DNA double-strand break repair ». Dans : *DNA Repair* **10.2**, page(s): 126–137.
- KEENEY, S (2001). « Mechanism and control of meiotic recombination initiation. » English. Dans : *Current topics in developmental biology* **52**, page(s): 1–53.
- KEENEY, S et C. GIROUX (jan. 1997). « Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family ». Dans : *Cell*, page(s): 1–10.
- KEENEY, S et M. J. NEALE (août 2006). « Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks : mechanism and regulation. » English. Dans : *Biochemical Society Transactions* **34.Pt 4**, page(s): 523–525.
- KEENEY, S. (jan. 2008). « Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. » English. Dans : *Genome dynamics and stability* **2**, page(s): 81–123.
- KERZENDORFER, C. et al. (juin 2006). « The Arabidopsis thaliana MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. » English. Dans : *Journal of Cell Science* **119.Pt 12**, page(s): 2486–2496.
- KIM, J. M., Y KEE, A GURTAN et A. D. D'ANDREA (mai 2008). « Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24 ». English. Dans : *Blood* **111.10**, page(s): 5215–5222.
- KIM, K. P. et al. (déc. 2010). « Sister Cohesion and Structural Axis Components Mediate Homolog Bias of Meiotic Recombination ». Dans : *Cell* **143.6**, page(s): 924–937.
- KIM, T. M., J. H. KO, Y. J. CHOI, L. HU et P. HASTY (juil. 2011). « Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis ». Dans : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **712.1-2**, page(s): 20–27.
- KING, J. S. et R. K. MORTIMER (déc. 1990). « A polymerization model of chiasma interference and corresponding computer simulation. » English. Dans : *Genetics* **126.4**, page(s): 1127–1138.
- KITAJIMA, T. S., S. A. KAWASHIMA et Y. WATANABE (fév. 2004). « The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. » English. Dans : *Nature* **427.6974**, page(s): 510–517.
- KLECKNER, N. (mar. 2006). « Chiasma formation : chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex ». English. Dans : *Chromosoma* **115.3**, page(s): 175–194.

- KLECKNER, N. et al. (août 2004). « A mechanical basis for chromosome function. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101.34**, page(s): 12592–12597.
- KNOLL, A et H PUCHTA (fév. 2011). « The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants ». anglais. Dans : *Journal of Experimental Botany* **62.5**, page(s): 1565–1579.
- KONG, A. et al. (juin 2002). « A high-resolution recombination map of the human genome ». Dans : *Nature Genetics*.
- KOOMEN, M. et al. (fév. 2002). « Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. » English. Dans : *Human Molecular Genetics* **11.3**, page(s): 273–281.
- KOSAMBI, D. D. (1943). « The estimation of map distances from recombination values ». Dans : *Annals of Eugenics* **12.1**, page(s): 172–175.
- KRATZ, K. et al. (juil. 2010). « Deficiency of FANCD2-Associated Nuclease KIAA1018/FAN1 Sensitizes Cells to Interstrand Crosslinking Agents ». Dans : *Cell* **142.1**, page(s): 77–88.
- KREJCI, L, V ALTMANNOVA, M SPIREK et X ZHAO (mar. 2012). « Homologous recombination and its regulation ». English. Dans : *Nucleic Acids Research*.
- KREJCI, L. et al. (mai 2003). « DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament ». Dans : *Nature* **423.6937**, page(s): 305–309.
- KUDO, N. R. et al. (juil. 2006). « Resolution of Chiasmata in Oocytes Requires Separase-Mediated Proteolysis ». English. Dans : *Cell* **126.1**, page(s): 135–146.
- KUGOU, K. et al. (juil. 2009). « Rec8 guides canonical Spo11 distribution along yeast meiotic chromosomes. » English. Dans : *Molecular biology of the cell* **20.13**, page(s): 3064–3076.
- KUMAR, R, H. M. BOURBON et B de MASSY (juin 2010). « Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice ». English. Dans : *Genes & Development* **24.12**, page(s): 1266–1280.
- KURUMIZAKA, H et al. (mai 2001). « Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3.Rad51C. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98.10**, page(s): 5538–5543.
- KURZBAUER, M.-T., C. UANSCHOU, D. CHEN et P. SCHLOGELHOFER (2012). « The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in Arabidopsis. » eng. Dans : *Plant Cell* **24.5**, page(s): 2058–2070.
- LAKE, C. M., R. J. NIELSEN et R. S. HAWLEY (fév. 2011). « The Drosophila Zinc Finger Protein Trade Embargo Is Required for Double Strand Break Formation in Meiosis ». English. Dans : *PLoS genetics* **7.2**, page(s): e1002005.

- LAMMERS, J. H. et al. (1994). « The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. » Dans : *Molecular and Cellular Biology* **14.2**, page(s): 1137–1146.
- LANGE, J. et al. (2011). « ATM controls meiotic double-strand-break formation. » eng. Dans : *Nature* **479.7372**, page(s): 237–240.
- LAO, J. P. et al. (déc. 2013). « Meiotic crossover control by concerted action of Rad51-Dmc1 in homolog template bias and robust homeostatic regulation. » English. Dans : *PLoS genetics* **9.12**, page(s): e1003978.
- LATYPOV, V et al. (mar. 2010). « Roles of Hop1 and Mek1 in Meiotic Chromosome Pairing and Recombination Partner Choice in *Schizosaccharomyces pombe* ». English. Dans : *Molecular and Cellular Biology* **30.7**, page(s): 1570–1581.
- LEE, K. Y., K. Y. CHUNG et H.-S. KOO (avr. 2010). « The involvement of FANCM, FANCI, and checkpoint proteins in the interstrand DNA crosslink repair pathway is conserved in *C. elegans* ». Dans : *DNA Repair* **9.4**, page(s): 374–382.
- LEHTONEN, J., M. D. JENNIONS et H. KOKKO (mar. 2012). « The many costs of sex ». Dans : *Trends in Ecology & Evolution* **27.3**, page(s): 172–178.
- LEI, K. et al. (2009). « SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. » eng. Dans : *Proc Natl Acad Sci U S A* **106.25**, page(s): 10207–10212.
- LEU, J.-Y., P. R. CHUA et G. S. ROEDER (1998). « The Meiosis-Specific Hop2 Protein of *S. cerevisiae* Ensures Synapsis between Homologous Chromosomes ». Dans : *Cell* **94.3**, page(s): 375–386.
- LEUNG, J. W. C. et al. (mar. 2012). « Fanconi anemia (FA) binding protein FAAP20 stabilizes FA complementation group A (FANCA) and participates in interstrand cross-link repair. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- L'HÔTE, D. et al. (nov. 2011). « Fidgetin-Like1 Is a Strong Candidate for a Dynamic Impairment of Male Meiosis Leading to Reduced Testis Weight in Mice ». anglais. Dans : *PLoS ONE* **6.11**, page(s): e27582.
- LHUISSIER, F. G. P., H. H. OFFENBERG, P. E. WITTICH, N. O. E. VISCHER et C HEYTING (mar. 2007). « The Mismatch Repair Protein MLH1 Marks a Subset of Strongly Interfering Crossovers in Tomato ». English. Dans : *THE PLANT CELL ONLINE* **19.3**, page(s): 862–876.
- LI, W (mai 2005). « The AtRAD51C Gene Is Required for Normal Meiotic Chromosome Synapsis and Double-Stranded Break Repair in Arabidopsis ». English. Dans : *PLANT PHYSIOLOGY* **138.2**, page(s): 965–976.

- LI, W. et al. (juil. 2004). « The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101.29**, page(s): 10596–10601.
- LIBERI, G. et M. FOIANI (2010). « The double life of Holliday junctions. » eng. Dans : *Cell Res* **20.6**, page(s): 611–613.
- LIBUDA, D. E., S. UZAWA, B. J. MEYER et A. M. VILLENEUVE (oct. 2013). « Meiotic chromosome structures constrain and respond to designation of crossover sites ». Dans : *Nature* **502.7473**, page(s): 703–706.
- LICHTEN, M et A. S. GOLDMAN (1995). « Meiotic recombination hotspots. » English. Dans : *Annual review of genetics* **29**, page(s): 423–444.
- LING, C. et al. (2007). « FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway ». Dans : *The EMBO Journal* **26.8**, page(s): 2104–2114.
- LIU, H., J. K. JANG, N. KATO et K. S. MCKIM (sept. 2002). « mei-P22 encodes a chromosome-associated protein required for the initiation of meiotic recombination in *Drosophila melanogaster*. » English. Dans : *Genetics* **162.1**, page(s): 245–258.
- LIU, J. et al. (oct. 2011). « Rad51 paralogues Rad55–Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation ». Dans : *Nature* **479.7372**, page(s): 245–248.
- LIU, T, G GHOSAL, J YUAN, J CHEN et J HUANG (août 2010). « FAN1 Acts with FANCI-FANCD2 to Promote DNA Interstrand Cross-Link Repair ». English. Dans : *Science* **329.5992**, page(s): 693–696.
- LIU, Y. et al. (jan. 2014). « Down-Regulation of Rad51 Activity during Meiosis in Yeast Prevents Competition with Dmc1 for Repair of Double-Strand Breaks ». English. Dans : *PLoS genetics* **10.1**, page(s): e1004005.
- LIU, Z et al. (sept. 2006). « Mapping PrBn and Other Quantitative Trait Loci Responsible for the Control of Homeologous Chromosome Pairing in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Haploids ». English. Dans : *Genetics* **174.3**, page(s): 1583–1596.
- LORENZ, A et M. C. WHITBY (août 2006). « Crossover promotion and prevention. » English. Dans : *Biochemical Society Transactions* **34.Pt 4**, page(s): 537–541.
- LORENZ, A, S. C. WEST et M. C. WHITBY (mar. 2010). « The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant ». anglais. Dans : *Nucleic Acids Research* **38.6**, page(s): 1866–1873.
- LORENZ, A et al. (juin 2012). « The Fission Yeast FANCM Ortholog Directs Non-Crossover Recombination During Meiosis ». English. Dans : *Science* **336.6088**, page(s): 1585–1588.
- LOSADA, A (juin 2005). « Dynamic molecular linkers of the genome : the first decade of SMC proteins ». English. Dans : *Genes & Development* **19.11**, page(s): 1269–1287.

- LOU, Q. et al. (mai 2013). « Integration of High-Resolution Physical and Genetic Map Reveals Differential Recombination Frequency between Chromosomes and the Genome Assembling Quality in Cucumber ». English. Dans : *PLoS ONE* **8.5**, page(s): e62676.
- LU, P et al. (mar. 2012). « Analysis of Arabidopsis genome-wide variations before and after meiosis and meiotic recombination by resequencing Landsberg erecta and all four products of a single meiosis ». English. Dans : *Genome Research* **22.3**, page(s): 508–518.
- LUKE-GLASER, S, L PINTARD, M TYERS et M PETER (sept. 2007). « The AAA-ATPase FIGL-1 controls mitotic progression, and its levels are regulated by the CUL-3MEL-26 E3 ligase in the *C. elegans* germ line ». anglais. Dans : *Journal of Cell Science* **120.18**, page(s): 3179–3187.
- LUO, Q. et al. (2013). « The role of OsMSH5 in crossover formation during rice meiosis ». Dans : *Molecular plant* **6.3**, page(s): 729–742.
- LUPAS, A. N. et J. MARTIN (déc. 2002). « AAA proteins. » English. Dans : *Current Opinion in Structural Biology* **12.6**, page(s): 746–753.
- LUTZMANN, M. et al. (août 2012). « MCM8- and MCM9-Deficient Mice Reveal Gametogenesis Defects and Genome Instability Due to Impaired Homologous Recombination ». Dans : *MOLCEL* **47.4**, page(s): 523–534.
- LYNN, A., R. SOUCEK et G. V. BÖRNER (août 2007). « ZMM proteins during meiosis : Crossover artists at work ». anglais. Dans : *Chromosome Research* **15.5**, page(s): 591–605.
- MACAISNE, N, J VIGNARD et R MERCIER (août 2011). « SHOC1 and PTD form an XPF-ERCC1-like complex that is required for formation of class I crossovers ». English. Dans : *Journal of Cell Science* **124.16**, page(s): 2687–2691.
- MACAISNE, N. et al. (sept. 2008). « SHOC1, an XPF Endonuclease-Related Protein, Is Essential for the Formation of Class I Meiotic Crossovers ». anglais. Dans : *Current Biology* **18.18**, page(s): 1432–1437.
- MACKAY, C. et al. (juil. 2010). « Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2 ». Dans : *Cell* **142.1**, page(s): 65–76.
- MANCERA, E., R. BOURGON, A. BROZZI, W. HUBER et L. M. STEINMETZ (juil. 2008). « High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast ». Dans : *Nature* **454.7203**, page(s): 479–485.
- MANKOURI, H et I HICKSON (déc. 2007). « The RecQ helicase–topoisomerase III–Rmi1 complex : a DNA structure-specific ‘dissolvasome’ ? » anglais. Dans : *Trends in Biochemical Sciences* **32.12**, page(s): 538–546.

- MARCON, E. et P. MOENS (déc. 2003). « MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. » English. Dans : *Genetics* **165.4**, page(s): 2283–2287.
- MARÉCHAL, A. et L. ZOU (2013). « DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases ». Dans : *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5.9**, page(s): a012716.
- MAREK, L. R. et A. E. BALE (nov. 2006). « Drosophila homologs of FANCD2 and FANCL function in DNA repair. » English. Dans : *DNA Repair* **5.11**, page(s): 1317–1326.
- MARTINI, E, R. DIAZ et N HUNTER (2006). « Crossover homeostasis in yeast meiosis ». Dans : *Cell*.
- MARTINI, E. et al. (sept. 2011). « Genome-Wide Analysis of Heteroduplex DNA in Mismatch Repair-Deficient Yeast Cells Reveals Novel Properties of Meiotic Recombination Pathways ». English. Dans : *PLoS genetics* **7.9**, page(s): e1002305.
- MASSON, J. (2001). « The Rad51 and Dmc1 recombinases : a non-identical twin relationship ». Dans : *Trends in Biochemical Sciences*.
- MASSY, B. de (jan. 2013). « Spp1 Links Sites of Meiotic DNA Double-Strand Breaks to Chromosome Axes ». Dans : *Molecular Cell* **49.1**, page(s): 3–5.
- MAYNARD-SMITH, J. (jan. 1998). *Evolutionary Genetics*. English.
- MAYR, E (1982). *The Growth of Biological Thought : Diversity, Evolution, and Inheritance*. Belknap Press.
- MAZIN, A. V., O. M. MAZINA, D. V. BUGREEV et M. J. ROSSI (mar. 2010). « Rad54, the motor of homologous recombination ». Dans : *DNA Repair* **9.3**, page(s): 286–302.
- MAZINA, O. M., A. V. MAZIN, T. NAKAGAWA, R. D. KOLODNER et S. C. KOWALCZYKOWSKI (avr. 2004). « *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51 ; implications for crossover control in meiotic recombination. » English. Dans : *Cell* **117.1**, page(s): 47–56.
- MCKIM, K. S. et A HAYASHI-HAGIHARA (sept. 1998). « mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog : evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. » English. Dans : *Genes & Development* **12.18**, page(s): 2932–2942.
- MCMAHILL, M. S., C. W. SHAM et D. K. BISHOP (2007). « Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis ». English. Dans : *PLoS biology* **5.11**, page(s): e299.
- M McNALLY, F. J. et R. D. VALE (1993). « Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules ». Dans : *Cell* **75.3**, page(s): 419–429.
- M McNALLY, K, A AUDHYA, K OEGEMA et F. J. McNALLY (déc. 2006). « Katanin controls mitotic and meiotic spindle length ». English. Dans : *The Journal of Cell Biology* **175.6**, page(s): 881–891.

- MCNALLY, K. P., O. A. BAZIRGAN et F. J. MCNALLY (mai 2000). « Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. » English. Dans : *Journal of Cell Science* **113** (Pt 9), page(s): 1623–1633.
- MCPEEK, M. S. et T. P. SPEED (fév. 1995). « Modeling interference in genetic recombination. » English. Dans : *Genetics* **139.2**, page(s): 1031–1044.
- MEDHURST, A. L. et al. (sept. 2006). « Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. » English. Dans : *Blood* **108.6**, page(s): 2072–2080.
- MEETEI, A. R. et al. (mai 2003). « A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. » anglais. Dans : *Molecular and Cellular Biology* **23.10**, page(s): 3417–3426.
- MEETEI, A. R., Z. YAN et W. WANG (2004). « FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination ». Dans : *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **3.2**, page(s): 179–181.
- MEETEI, A. R. et al. (août 2005). « A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M ». Dans : *Nature Genetics* **37.9**, page(s): 958–963.
- MERCIER, R. et M. GRELON (2008). « Meiosis in plants : ten years of gene discovery ». anglais. Dans : *Cytogenetic and Genome Research* **120.3-4**, page(s): 281–290.
- MERCIER, R. et al. (avr. 2005). « Two Meiotic Crossover Classes Cohabit in Arabidopsis ». anglais. Dans : *Current Biology* **15.8**, page(s): 692–701.
- MERRILL, S. A. et P. I. HANSON (nov. 2010). « Activation of Human VPS4A by ESCRT-III Proteins Reveals Ability of Substrates to Relieve Enzyme Autoinhibition ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **285.46**, page(s): 35428–35438.
- MESELSON, M. (sept. 1964). « On the mechanism of genetic recombination between DNA molecules ». Dans : *Journal of Molecular Biology* **9.3**, page(s): 734–745.
- METS, D. G. et B. J. MEYER (oct. 2009). « Condensins Regulate Meiotic DNA Break Distribution, thus Crossover Frequency, by Controlling Chromosome Structure ». Dans : *Cell* **139.1**, page(s): 73–86.
- MEUWISSEN, R. L. et al. (1992). « A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. » Dans : *The EMBO Journal* **11.13**, page(s): 5091.
- MÉZARD, C., J. VIGNARD, J. DROUAUD et R. MERCIER (fév. 2007). « The road to crossovers : plants have their say ». anglais. Dans : *Trends in Genetics* **23.2**, page(s): 91–99.
- MITCHEL, K., K. LEHNER et S. JINKS-ROBERTSON (mar. 2013). « Heteroduplex DNA Position Defines the Roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 Helicases in Promoting Distinct Recombination Outcomes ». English. Dans : *PLoS genetics* **9.3**, page(s): e1003340.

- MOENS, P. B. et R. E. PEARLMAN (1988). « Chromatin Organization at Meiosis ». Dans : *Bioessays* **9.5**, page(s): 151–153.
- MOGK, A. et al. (avr. 2004). « Broad yet high substrate specificity : the challenge of AAA+ proteins ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **146.1-2**, page(s): 90–98.
- MORGAN, T. H. (1912). « Complete linkage in the second chromosome of the male of *Drosophila* ». Dans : *Science* **36**, page(s): 719–720.
- MOSES, M. J. (1956). « Chromosomal structures in crayfish spermatocytes ». Dans : *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **2.2**, page(s): 215–218.
- (sept. 1958). « The relation between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander (*Plethodon cinereus*). » English. Dans : *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **4.5**, page(s): 633–638.
- (mar. 2006). « A new chromosome structure is revealed ». English. Dans : *Chromosoma* **115.3**, page(s): 152–154.
- MUKHERJEE, S. et al. (juin 2012). « Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis ». English. Dans : *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11.12**, page(s): 2359–2366.
- MULLER, H. J. (1916). *The mechanism of crossing-over*. Columbia university.
- MUNZ, P. (1994). « An analysis of interference in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. » Dans : *Genetics* **137.3**, page(s): 701–707.
- MYERS, S et al. (fév. 2010). « Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the PRDM9 Gene in Meiotic Recombination ». English. Dans : *Science* **327.5967**, page(s): 876–879.
- NAKAGAWA, T et H OGAWA (oct. 1999). « The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. » English. Dans : *The EMBO Journal* **18.20**, page(s): 5714–5723.
- NASMYTH, K. et C. H. HAERING (déc. 2009). « Cohesin : Its Roles and Mechanisms ». English. Dans : *Annual review of genetics* **43.1**, page(s): 525–558.
- NEALE, M. J., J. PAN et S. KEENEY (août 2005). « Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks ». Dans : *Nature cell biology* **436.7053**, page(s): 1053–1057.
- NICOLAS, S. D. et al. (fév. 2007). « Homeologous Recombination Plays a Major Role in Chromosome Rearrangements That Occur During Meiosis of *Brassica napus* Haploids ». English. Dans : *Genetics* **175.2**, page(s): 487–503.
- NIEDZWIEDZ, W. et al. (août 2004). « The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. » English. Dans : *Molecular Cell* **15.4**, page(s): 607–620.

- NILSSON, N. O. et T SÄLL (mar. 1995). « A model of chiasma reduction of closely formed crossovers. » English. Dans : *Journal of Theoretical Biology* **173.1**, page(s): 93–98.
- NIMONKAR, A. V. et al. (juin 2012). « *Saccharomyces cerevisiae* Dmc1 and Rad51 preferentially function with Tid1 and Rad54, respectively, to promote DNA strand invasion during genetic recombination ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry*.
- NIU, H. et al. (déc. 2005). « Partner choice during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. » English. Dans : *Molecular biology of the cell* **16.12**, page(s): 5804–5818.
- NIU, H. et al. (nov. 2009). « Regulation of Meiotic Recombination via Mek1-Mediated Rad54 Phosphorylation ». Dans : *Molecular Cell* **36.3**, page(s): 393–404.
- NORDBORG, M. et al. (2005). « The Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana* ». English. Dans : *PLoS biology* **3.7**, page(s): e196.
- OAKLEY, H. A. (1985). « Meiosis in *Mesostoma ehrenbergii ehrenbergii* (Turbellaria, Rhabdocoela) ». Dans : *Chromosoma* **91.2**, page(s): 95–100.
- OFFENBERG, H. H. et al. (1998). « SCP2 : a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat ». Dans : *Nucleic acids research* **26.11**, page(s): 2572–2579.
- OGURA, T., S. W. WHITEHEART et A. J. WILKINSON (avr. 2004). « Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **146.1-2**, page(s): 106–112.
- OH, S. D., J. P. LAO, A. F. TAYLOR, G. R. SMITH et N. HUNTER (août 2008). « RecQ Helicase, Sgs1, and XPF Family Endonuclease, Mus81-Mms4, Resolve Aberrant Joint Molecules during Meiotic Recombination ». English. Dans : *Molecular Cell* **31.3**, page(s): 324–336.
- ONITAKE, A., K. YAMANAKA, M. ESAKI et T. OGURA (août 2012). « *Caenorhabditis elegans* fidgetin homolog FIGL-1, a nuclear-localized AAA ATPase, binds to SUMO ». Dans : *Journal of Structural Biology* **179.2**, page(s): 143–151.
- OSMAN, F., J. DIXON, C. L. DOE et M. C. WHITBY (sept. 2003). « Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions : a role for Mus81-Eme1 in meiosis. » English. Dans : *Molecular Cell* **12.3**, page(s): 761–774.
- OSMAN, K., E. SANCHEZ-MORAN, S. C. MANN, G. H. JONES et F. C. H. FRANKLIN (jan. 2009). « Replication protein A (AtRPA1a) is required for class I crossover formation but is dispensable for meiotic DNA break repair ». Dans : *The EMBO Journal* **28.4**, page(s): 394–404.

- OTTO, S. P. et T. LENORMAND (avr. 2002). « EVOLUTION OF SEX : RESOLVING THE PARADOX OF SEX AND RECOMBINATION ». Dans : *Nature Reviews Genetics* **3.4**, page(s): 252–261.
- PÁL, C. et L. D. HURST (fév. 2003). « Evidence for co-evolution of gene order and recombination rate ». Dans : *Nature Genetics* **33.3**, page(s): 392–395.
- PAN, J. et al. (mar. 2011). « A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation ». Dans : *Cell* **144.5**, page(s): 719–731.
- PANIZZA, S. et al. (août 2011). « Spo11-Accessory Proteins Link Double- Strand Break Sites to the Chromosome Axis in Early Meiotic Recombination ». Dans : *Cell* **146.3**, page(s): 372–383.
- PARVANOV, E. D., P. M. PETKOV et K PAIGEN (fév. 2010). « Prdm9 Controls Activation of Mammalian Recombination Hotspots ». English. Dans : *Science* **327.5967**, page(s): 835–835.
- PASIERBEK, P (juin 2001). « A Caenorhabditis elegans cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction ». Dans : *Genes & Development* **15.11**, page(s): 1349–1360.
- PAWLOWSKI, W. P. (jan. 2004). « Coordination of Meiotic Recombination, Pairing, and Synapsis by PHS1 ». English. Dans : *Science* **303.5654**, page(s): 89–92.
- PEACOCK, W., R. BROCK, A. SCIENCE et N. SCIENCES (1968). *Replication and Recombination of Genetic Material*. Australian Academy of Science.
- PELLOQUIN, L, P BELENGUER, Y MENON, N GAS et B DUCOMMUN (nov. 1999). « Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein. » English. Dans : *Journal of Cell Science* **112 (Pt 22)**, page(s): 4151–4161.
- PENG, W et al. (août 2013). « Structural Insights into the Unusually Strong ATPase Activity of the AAA Domain of the Caenorhabditis elegans Fidgetin-like 1 (FIGL-1) Protein ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **288.41**, page(s): 29305–29312.
- PENKNER, A. et al. (nov. 2007). « A conserved function for a Caenorhabditis elegans Com1/Sae2/CtIP protein homolog in meiotic recombination ». Dans : *The EMBO Journal* **26.24**, page(s): 5071–5082.
- PENKNER, A. M. et al. (2009). « Meiotic chromosome homology search involves modifications of the nuclear envelope protein Matefin/SUN-1. » eng. Dans : *Cell* **139.5**, page(s): 920–933.
- PERKINS, D. D. (1949). « Biochemical mutants in the smut fungus Ustilago maydis ». Dans : *Genetics* **34.5**, page(s): 607.

- PERRY, J., N. KLECKNER et G. V. BÖRNER (2005). « Bioinformatic analyses implicate the collaborating meiotic crossover/chiasma proteins Zip2, Zip3, and Spo22/Zip4 in ubiquitin labeling ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102.49**, page(s): 17594–17599.
- PETUKHOVA, G. V. et al. (avr. 2005). « The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination ». Dans : *Nature Structural & Molecular Biology* **12.5**, page(s): 449–453.
- PITTMAN, D. L. et al. (1998). « Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for Dmc1, a Germline-Specific RecA Homolog ». Dans : *Molecular Cell* **1.5**, page(s): 697–705.
- POCHART, P, D WOLTERING et N. M. HOLLINGSWORTH (nov. 1997). « Conserved properties between functionally distinct MutS homologs in yeast. » English. Dans : *The Journal of biological chemistry* **272.48**, page(s): 30345–30349.
- POLITO, D et al. (jan. 2014). « The Carboxy Terminus of FANCE Recruits FANCD2 to the FA E3 Ligase Complex to Promote the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry*.
- PONTERCORVO, G, J. A. ROPER et E FORBES (fév. 1953). « Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. » English. Dans : *Journal of general microbiology* **8.1**, page(s): 198–210.
- POTTER, H. et D. DRESSLER (1976). « On the mechanism of genetic recombination : electron microscopic observation of recombination intermediates ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73.9**, page(s): 3000–3004.
- PRADILLO, M. (fév. 2014). « On the role of AtDMC1, AtRAD51 and its paralogs during Arabidopsis meiosis ». Dans : page(s): 1–13.
- PRAKASH, R et al. (jan. 2009). « Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops : implications for crossover control in mitotic recombination ». English. Dans : *Genes & Development* **23.1**, page(s): 67–79.
- QIAO, H. et al. (jan. 2014). « Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination ». Dans : *Nature Publishing Group* **46.2**, page(s): 194–199.
- RABITSCH, K. P. et al. (2001). « A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression ». Dans : *Current biology : CB* **11.13**, page(s): 1001–1009.
- RASMUSSEN, S. W. (mar. 1977). « Meiosis in *Bombyx mori* females. » English. Dans : *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **277.955**, page(s): 343–350.

- RAVI, M. et S. W. L. CHAN (mar. 2010). « Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination ». Dans : *Nature* **464.7288**, page(s): 615–618.
- REDDY, K. C. et A. M. VILLENEUVE (2004). « C. elegans HIM-17 Links Chromatin Modification and Competence for Initiation of Meiotic Recombination ». Dans : *Cell* **118.4**, page(s): 439–452.
- REYNOLDS, A. et al. (fév. 2013). « RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis ». Dans : *Nature Publishing Group* **45.3**, page(s): 269–278.
- RICHARDSON, C., M. E. MOYNAHAN et M. JASIN (1998). « Double-strand break repair by interchromosomal recombination : suppression of chromosomal translocations ». Dans : *Genes & development* **12.24**, page(s): 3831–3842.
- ROBERTS, N. Y., K OSMAN et S. J. ARMSTRONG (2009). « Telomere Distribution and Dynamics in Somatic and Meiotic Nuclei of *Arabidopsis thaliana* ». English. Dans : *Cytogenetic and Genome Research* **124.3-4**, page(s): 193–201.
- ROLL-MECAK, A. et R. D. VALE (jan. 2008). « Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin ». Dans : *Nature* **451.7176**, page(s): 363–367.
- ROMANIENKO, P. J. et R. D. CAMERINI-OTERO (nov. 2000). « The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. » English. Dans : *Molecular Cell* **6.5**, page(s): 975–987.
- RONCERET, A., M.-P. DOUTRIAUX, I. N. GOLUBOVSKAYA et W. P. PAWLOWSKI (nov. 2009). « PHS1 regulates meiotic recombination and homologous chromosome pairing by controlling the transport of RAD50 to the nucleus. » anglais. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106.47**, page(s): 20121–20126.
- ROSADO, I. V., W NIEDZWIEDZ, A. F. ALPI et K. J. PATEL (juil. 2009). « The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair ». English. Dans : *Nucleic Acids Research* **37.13**, page(s): 4360–4370.
- ROSS, K. J. et al. (déc. 1997). « Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. » English. Dans : *Chromosome Research* **5.8**, page(s): 551–559.
- ROSS IBARRA, J. (jan. 2004). « The Evolution of Recombination under Domestication : A Test of Two Hypotheses ». English. Dans : *The American Naturalist* **163.1**, page(s): 105–112.
- ROSS-MACDONALD, P et G. S. ROEDER (déc. 1994). « Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. » English. Dans : *Cell* **79.6**, page(s): 1069–1080.

- ROSU, S. et al. (août 2013). « The C. elegans DSB-2 Protein Reveals a Regulatory Network that Controls Competence for Meiotic DSB Formation and Promotes Crossover Assurance ». English. Dans : *PLoS genetics* **9.8**, page(s): e1003674.
- ROUSSELLE, Y, M THOMAS, N GALIC, I BONNIN et I GOLDRINGER (juin 2010). « Inbreeding depression and low between-population heterosis in recently diverged experimental populations of a selfing species ». Dans : *Heredity* **106.2**, page(s): 289–299.
- SAEKI, T., I. MACHIDA et S. NAKAI (1980). « Genetic control of diploid recovery after γ -irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ». Dans : *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **73.2**, page(s): 251–265.
- SAINTENAC, C et al. (nov. 2008). « Detailed Recombination Studies Along Chromosome 3B Provide New Insights on Crossover Distribution in Wheat (*Triticum aestivum* L.) » English. Dans : *Genetics* **181.2**, page(s): 393–403.
- SAKUNO, T. et Y. WATANABE (mar. 2009). « Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions ». English. Dans : *Chromosome Research* **17.2**, page(s): 239–249.
- SAN-SEGUNDO, P. A. et G. S. ROEDER (avr. 1999). « Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. » English. Dans : *Cell* **97.3**, page(s): 313–324.
- SANCHEZ-MORAN, E et al. (2008). « ASY1 coordinates early events in the plant meiotic recombination pathway ». anglais. Dans : *Cytogenetic and Genome Research* **120.3-4**, page(s): 302–312.
- SANCHEZ-MORAN, E., J. L. SANTOS, G. H. JONES et F. C. H. FRANKLIN (sept. 2007). « ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. » English. Dans : *Genes & Development* **21.17**, page(s): 2220–2233.
- SANTOS, T. de los et al. (mai 2003). « The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. » English. Dans : *Genetics* **164.1**, page(s): 81–94.
- SARTORI, A. A. et al. (oct. 2007). « Human CtIP promotes DNA end resection ». Dans : *Nature* **450.7169**, page(s): 509–514.
- SATO, A. et al. (2009). « Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to coordinate meiotic chromosome pairing and synapsis. » eng. Dans : *Cell* **139.5**, page(s): 907–919.
- SCHOMMER, C., A. BEVEN, T. LAWRENSON, P. SHAW et R. SABLowski (oct. 2003). « AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in Arabidopsis meiosis ». English. Dans : *The Plant Journal* **36.1**, page(s): 1–11.
- SCHOPF, J. (2002). *Life's Origin : The Beginnings of Biological Evolution*. Life's Origin : The Beginnings of Biological Evolution. University of California Press.

- SCHWACHA, A et N KLECKNER (déc. 1995). « Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. » anglais. Dans : *Cell* **83.5**, page(s): 783–791.
- (sept. 1997). « Interhomolog bias during meiotic recombination : meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. » anglais. Dans : *Cell* **90.6**, page(s): 1123–1135.
- SCULLY, R et al. (jan. 1997). « Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. » English. Dans : *Cell* **88.2**, page(s): 265–275.
- SEKI, S. et al. (mar. 2007). « A requirement of FancL and FancD2 monoubiquitination in DNA repair ». English. Dans : *Genes to Cells* **12.3**, page(s): 299–310.
- SHAKED, H., C. MELAMED-BESSUDO et A. A. LEVY (août 2005). « High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102.34**, page(s): 12265–12269.
- SHARP, D. J. et J. L. ROSS (juil. 2012). « Microtubule-severing enzymes at the cutting edge ». English. Dans : *Journal of Cell Science* **125.11**, page(s): 2561–2569.
- SHERWOOD, N. T., Q. SUN, M. XUE, B. ZHANG et K. ZINN (nov. 2004). « Drosophila Spastin Regulates Synaptic Microtubule Networks and Is Required for Normal Motor Function ». English. Dans : *PLoS biology* **2.12**, page(s): e429.
- SHINOHARA, A, H OGAWA et T OGAWA (mai 1992). « Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. » English. Dans : *Cell* **69.3**, page(s): 457–470.
- SHINOHARA, A, S GASIOR, T OGAWA, N KLECKNER et D. K. BISHOP (oct. 1997). « *Saccharomyces cerevisiae* recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. » English. Dans : *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **2.10**, page(s): 615–629.
- SHINOHARA, M., S. D. OH, N. HUNTER et A. SHINOHARA (fév. 2008). « Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis ». Dans : *Nature Genetics* **40.3**, page(s): 299–309.
- SHTILERMAN, M (avr. 1999). « Chaperonin Function : Folding by Forced Unfolding ». Dans : *Science* **284.5415**, page(s): 822–825.
- SIM, S.-C. et al. (sept. 2012). « High-Density SNP Genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Reveals Patterns of Genetic Variation Due to Breeding ». English. Dans : *PLoS ONE* **7.9**, page(s): e45520.
- SINGH, T. R. et al. (mai 2009). « Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M ». English. Dans : *Blood*.

- SINGH, T. R. et al. (mar. 2010). « MHF1-MHF2, a Histone-Fold-Containing Protein Complex, Participates in the Fanconi Anemia Pathway via FANCM ». Dans : *Molecular Cell* **37.6**, page(s): 879–886.
- SMITH, G. R., M. N. BODDY, P. SHANAHAN et P. RUSSELL (déc. 2003). « Fission yeast Mus81.Eme1 Holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion. » English. Dans : *Genetics* **165.4**, page(s): 2289–2293.
- SMOGORZEWSKA, A. et al. (avr. 2007). « Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair ». English. Dans : *Cell* **129.2**, page(s): 289–301.
- SMOGORZEWSKA, A. et al. (juil. 2010). « A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair ». Dans : *Molecular Cell* **39.1**, page(s): 36–47.
- SNIDER, J., G. THIBAUT et W. A. HURY (2008). « The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins ». English. Dans : *Genome Biology* **9.4**, page(s): 216.
- SNOWDEN, T., S. ACHARYA, C. BUTZ, M. BERARDINI et R. FISHEL (août 2004). « hMSH4-hMSH5 Recognizes Holliday Junctions and Forms a Meiosis-Specific Sliding Clamp that Embraces Homologous Chromosomes ». anglais. Dans : *Molecular Cell* **15.3**, page(s): 437–451.
- SOLINGER, J. A., K. KIANITSA et W.-D. HEYER (2002). « Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51 : dsDNA filaments ». Dans : *Molecular Cell* **10.5**, page(s): 1175–1188.
- SOMMERMEYER, V., C. BÉNEUT, E. CHAPLAIS, M.-E. SERRENTINO et V. BORDE (jan. 2013). « Spp1, a Member of the Set1 Complex, Promotes Meiotic DSB Formation in Promoters by Tethering Histone H3K4 Methylation Sites to Chromosome Axes ». Dans : *Molecular Cell* **49.1**, page(s): 43–54.
- SONODA, E et al. (jan. 1998). « Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. » English. Dans : *The EMBO Journal* **17.2**, page(s): 598–608.
- SOUSTELLE, C., M. VEDEL, R. KOLODNER et A. NICOLAS (juin 2002). « Replication protein A is required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. » English. Dans : *Genetics* **161.2**, page(s): 535–547.
- STACEY, N. J. et al. (oct. 2006). « Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination ». English. Dans : *The Plant Journal* **48.2**, page(s): 206–216.
- STAHL, F. W. (sept. 2004). « Does Crossover Interference Count in *Saccharomyces cerevisiae*? » English. Dans : *Genetics* **168.1**, page(s): 35–48.
- (mai 2008). « On the "NPD Ratio" as a Test for Crossover Interference ». English. Dans : *Genetics* **179.1**, page(s): 701–704.

- STAHL, F. W. et H. M. FOSS (oct. 2010). « A Two-Pathway Analysis of Meiotic Crossing Over and Gene Conversion in *Saccharomyces cerevisiae* ». English. Dans : *Genetics* **186.2**, page(s): 515–536.
- STAMPER, E. L. et al. (2013). « Identification of DSB-1, a protein required for initiation of meiotic recombination in *Caenorhabditis elegans*, illuminates a crossover assurance checkpoint. » eng. Dans : *PLoS Genet* **9.8**, page(s): e1003679.
- STOPPIN-MELLET, V. et al. (déc. 2007). « Arabidopsis katanin binds microtubules using a multimeric microtubule-binding domain ». English. Dans : *Plant Physiology and Biochemistry* **45.12**, page(s): 867–877.
- STORLAZZI, A., L. XU, A. SCHWACHA et N. KLECKNER (1996). « Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93.17**, page(s): 9043–9048.
- STURTEVANT, A. H. (1913). « The linear arrangement of six sexlinked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association ». Dans : *Journal of experimental zoology* **14.1**, page(s): 43–59.
- SUN, W. et al. (oct. 2008). « The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair. » English. Dans : *Molecular Cell* **32.1**, page(s): 118–128.
- SUNG, P (août 2003). « Rad51 Recombinase and Recombination Mediators ». English. Dans : *Journal of Biological Chemistry* **278.44**, page(s): 42729–42732.
- SVENDSEN, J. M. et J. W. HARPER (mar. 2010). « GEN1/Yen1 and the SLX4 complex : solutions to the problem of Holliday junction resolution ». English. Dans : *Genes & Development* **24.6**, page(s): 521–536.
- SVENDSEN, J. M. et al. (juil. 2009). « Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair ». Dans : *Cell* **138.1**, page(s): 63–77.
- SYM, M., J. ENGEBRECHT et G. S. ROEDER (1993). « ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis ». Dans : *Cell* **72.3**, page(s): 365–378.
- SZOSTAK, J. W., T. L. ORR-WEAVER, R. J. ROTHSTEIN et F. W. STAHL (1983). « The double-strand-break repair model for recombination ». Dans : *Cell* **33.1**, page(s): 25–35.
- TAGLIARO-JAHNS, M., A. CHAMBON, D. VEZON, C MEZARD et M. GRELON. « AXR1 (Article sous presse) ». Dans : *PLoS biology*.
- TARSOUNAS, M, T MORITA, R. E. PEARLMAN et P. B. MOENS (oct. 1999). « RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and

- synaptonemal complexes. » English. Dans : *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **147.2**, page(s): 207–220.
- TERENTYEV, Y et al. (juil. 2010). « Evidence that MEK1 positively promotes interhomologue double-strand break repair ». English. Dans : *Nucleic Acids Research* **38.13**, page(s): 4349–4360.
- TERRET, M.-E., A. CHAIGNE et M.-H. VERLHAC (nov. 2013). « Mouse oocyte, a paradigm of cancer cell ». English. Dans : *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **12.21**, page(s): 0–6.
- TESSÉ, S., A. STORLAZZI, N. KLECKNER, S. GARGANO et D. ZICKLER (2003). « Localization and roles of Ski8p protein in *Sordaria* meiosis and delineation of three mechanistically distinct steps of meiotic homolog juxtaposition ». Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100.22**, page(s): 12865–12870.
- THACKER, D., N. MOHIBULLAH, X. ZHU et S. KEENEY (avr. 2014). « Homologue engagement controls meiotic DNA break number and distribution ». Dans : *Nature*, page(s): 1–19.
- THOMPSON, D. A. et F. W. STAHL (oct. 1999). « Genetic control of recombination partner preference in yeast meiosis. Isolation and characterization of mutants elevated for meiotic unequal sister-chromatid recombination. » English. Dans : *Genetics* **153.2**, page(s): 621–641.
- TRAUT, W. (1977). « A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera) ». Dans : *Genetica* **47.2**, page(s): 135–142.
- TROTTA, N., G. ORSO, M. G. ROSSETTO, A. DAGA et K. BROADIE (juil. 2004). « The Hereditary Spastic Paraplegia Gene, spastin, Regulates Microtubule Stability to Modulate Synaptic Structure and Function ». English. Dans : *Current Biology* **14.13**, page(s): 1135–1147.
- TSUBOUCHI, H. et G. S. ROEDER (juil. 2006a). « Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. » English. Dans : *Genes & Development* **20.13**, page(s): 1766–1775.
- TSUBOUCHI, T., H. ZHAO et G. S. ROEDER (juin 2006b). « The Meiosis-Specific Zip4 Protein Regulates Crossover Distribution by Promoting Synaptonemal Complex Formation Together with Zip2 ». English. Dans : *Developmental Cell* **10.6**, page(s): 809–819.
- TSUZUKI, T et al. (juin 1996). « Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93.13**, page(s): 6236–6240.
- UANSCHOU, C et al. (jan. 2014). « Sufficient Amounts of Functional HOP2/MND1 Complex Promote Interhomolog DNA Repair but Are Dispensable for Intersister DNA

- Repair during Meiosis in Arabidopsis ». English. Dans : *THE PLANT CELL ONLINE* **25.12**, page(s): 4924–4940.
- UANSCHOU, C. et al. (nov. 2007). « A novel plant gene essential for meiosis is related to the human CtIP and the yeast COM1/SAE2 gene ». Dans : *The EMBO Journal* **26.24**, page(s): 5061–5070.
- UEMATSU, Y, H KIEFER, R SCHULZE, K FISCHER-LINDAHL et M STEINMETZ (déc. 1986). « Molecular characterization of a meiotic recombinational hotspot enhancing homologous equal crossing-over. » English. Dans : *The EMBO Journal* **5.12**, page(s): 3408–2129.
- UHLMANN, F et K NASMYTH (oct. 1998). « Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. » English. Dans : *Current biology : CB* **8.20**, page(s): 1095–1101.
- VAJJHALA, P. R., J. S. WONG, H.-Y. TO et A. L. MUNN (avr. 2006). « The β domain is required for Vps4p oligomerization into a functionally active ATPase ». English. Dans : *FEBS Journal* **273.11**, page(s): 2357–2373.
- VALE, R. D. (juil. 2000). « AAA proteins. Lords of the ring. » English. Dans : *The Journal of Cell Biology* **150.1**, page(s): F13–9.
- VAN VALEN, L. (1973). « A new evolutionary law ». Dans : *Evolutionary theory* **1**, page(s): 1–30.
- VAN’T HOF, J, A KUNIYUKI et C. A. BJERKNES (1978). « The size and number of replicon families of chromosomal DNA of Arabidopsis thaliana ». Dans : *Chromosoma* **68.3**, page(s): 269–285.
- VAZ, F. et al. (avr. 2010). « Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder ». Dans : *Nature Publishing Group* **42.5**, page(s): 406–409.
- VEAUTE, X. et al. (2003). « The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments ». Dans : *Nature* **423.6937**, page(s): 309–312.
- VEEN, J. E. van et R. S. HAWLEY (oct. 2003). « Meiosis : When Even Two Is a Crowd ». English. Dans : *Current Biology* **13.21**, page(s): R831–R833.
- VIENNE, D. de (1998). *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Mieux comprendre. INRA.
- VIGNARD, J. et al. (2007). « The Interplay of RecA-related Proteins and the MND1–HOP2 Complex during Meiosis in Arabidopsis thaliana ». English. Dans : *PLoS genetics* **3.10**, page(s): e176.
- WALKER, J. E., M SARASTE, M. J. RUNSWICK et N. J. GAY (1982). « Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. » English. Dans : *The EMBO Journal* **1.8**, page(s): 945–951.

- WANG, C. et M. W. LAMBERT (juil. 2010a). « The Fanconi Anemia Protein, FANCG, Binds to the ERCC1-XPF Endonuclease via Its Tetratricopeptide Repeats and the Central Domain of ERCC1 ». English. Dans : *Biochemistry* **49.26**, page(s): 5560–5569.
- WANG, K. et al. (juil. 2012). « The Role of Rice HEI10 in the Formation of Meiotic Crossovers ». English. Dans : *PLoS genetics* **8.7**, page(s): e1002809.
- WANG, M et al. (mar. 2010b). « The Central Element Protein ZEP1 of the Synaptonemal Complex Regulates the Number of Crossovers during Meiosis in Rice ». anglais. Dans : *THE PLANT CELL ONLINE* **22.2**, page(s): 417–430.
- WANG, T. F., N KLECKNER et N HUNTER (nov. 1999). « Functional specificity of MutL homologs in yeast : evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96.24**, page(s): 13914–13919.
- WANG, W. et al. (sept. 2013). « Structural peculiarities of the (MHF1-MHF2)₄ octamer provide a long DNA binding patch to anchor the MHF-FANCM complex to chromatin : A solution SAXS study ». Dans : *FEBS LETTERS* **587.18**, page(s): 2912–2917.
- WARD, J. O. et al. (2007). « Mutation in Mouse Hei10, an E3 Ubiquitin Ligase, Disrupts Meiotic Crossing Over ». English. Dans : *PLoS genetics* **3.8**, page(s): e139.
- WATANABE, Y et P NURSE (juil. 1999). « Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. » English. Dans : *Nature* **400.6743**, page(s): 461–464.
- WEBBER, H. A., L. HOWARD et S. E. BICKEL (2004). « The cohesion protein ORD is required for homologue bias during meiotic recombination ». Dans : *The Journal of cell biology* **164.6**, page(s): 819–829.
- WEITH, A et W TRAUT (1980). « Synaptonemal complexes with associated chromatin in a moth, *Ephestia kuehniella* Z. » Dans : *Chromosoma* **78.3**, page(s): 275–291.
- WESOLY, J et al. (jan. 2006). « Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, DNA Damage Repair, and Meiosis ». English. Dans : *Molecular and Cellular Biology* **26.3**, page(s): 976–989.
- WHITBY, M. C. (déc. 2005). « Making crossovers during meiosis. » anglais. Dans : *Biochemical Society Transactions* **33.Pt 6**, page(s): 1451–1455.
- (mar. 2010). « The FANCM family of DNA helicases/translocases ». Dans : *DNA Repair* **9.3**, page(s): 224–236.
- WHITNEY, M. A. et al. (juil. 1996). « Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. » English. Dans : *Blood* **88.1**, page(s): 49–58.

- WHITTON, J., C. J. SEARS, E. J. BAACK et S. P. OTTO (jan. 2008). « The Dynamic Nature of Apomixis in the Angiosperms ». English. Dans : *International Journal of Plant Sciences* **169.1**, page(s): 169–182.
- WIESE, C. et al. (fév. 2002). « Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. » English. Dans : *Nucleic Acids Research* **30.4**, page(s): 1001–1008.
- WIJNKER, E. et al. (jan. 2013). « The genomic landscape of meiotic crossovers and gene conversions in *Arabidopsis thaliana* ». English. Dans : *eLife* **2.0**, page(s): e01426–e01426.
- WILSON, J. B. et al. (jan. 2008). « FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3 ». Dans : *Oncogene* **27.26**, page(s): 3641–3652.
- WOJTASZ, L. et al. (oct. 2009). « Mouse HORMAD1 and HORMAD2, Two Conserved Meiotic Chromosomal Proteins, Are Depleted from Synapsed Chromosome Axes with the Help of TRIP13 AAA-ATPase ». English. Dans : *PLoS genetics* **5.10**, page(s): e1000702.
- WOOD, A. J., A. F. SEVERSON et B. J. MEYER (mai 2010). « Condensin and cohesin complexity : the expanding repertoire of functions ». Dans : *Nature Reviews Genetics* **11.6**, page(s): 391–404.
- WOOD, J. D. (août 2006). « The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo ». English. Dans : *Human Molecular Genetics* **15.18**, page(s): 2763–2771.
- WU, L. et I. D. HICKSON (2003). « The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination ». Dans : *Nature* **426.6968**, page(s): 870–874.
- XIA, B. et al. (juin 2006). « Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2 ». English. Dans : *Molecular Cell* **22.6**, page(s): 719–729.
- XU, H., M. D. BEASLEY, W. D. WARREN, G. T. J. van der HORST et M. J. MCKAY (juin 2005). « Absence of Mouse REC8 Cohesin Promotes Synapsis of Sister Chromatids in Meiosis ». English. Dans : *Developmental Cell* **8.6**, page(s): 949–961.
- YAKUSHIJI, Y., K. YAMANAKA et T. OGURA (déc. 2004). « Identification of a cysteine residue important for the ATPase activity of *C. elegans* fidgetin homologue ». English. Dans : *FEBS LETTERS* **578.1-2**, page(s): 191–197.
- YAKUSHIJI, Y., S. NISHIKORI, K. YAMANAKA et T. OGURA (oct. 2006). « Mutational analysis of the functional motifs in the ATPase domain of *Caenorhabditis elegans* fidgetin homologue FIGL-1 : Firm evidence for an intersubunit catalysis mechanism of ATP hydrolysis by AAA ATPases ». English. Dans : *Journal of Structural Biology* **156.1**, page(s): 93–100.

- YAN, Z. et al. (mar. 2010). « A Histone-Fold Complex and FANCM Formes a Conserved DNA-Remodeling Complex to Maintain Genome Stability ». English. Dans : *Molecular Cell* **37.6**, page(s): 865–878.
- YANG, H.-y., K. McNALLY et F. J. McNALLY (août 2003). « MEI-1/katanin is required for translocation of the meiosis I spindle to the oocyte cortex in *C. elegans* ». English. Dans : *Developmental Biology* **260.1**, page(s): 245–259.
- YANG, Y, C MAHAFFEY, N BERUBE, A NYSTUEN et W FRANKEL (mar. 2005). « Functional characterization of fidgetin, an AAA-family protein mutated in fidget mice ». English. Dans : *Experimental Cell Research* **304.1**, page(s): 50–58.
- YILDIZ, O., S. MAJUMDER, B. KRAMER et J. J. SEKELSKY (déc. 2002). « Drosophila MUS312 interacts with the nucleotide excision repair endonuclease MEI-9 to generate meiotic crossovers. » English. Dans : *Molecular Cell* **10.6**, page(s): 1503–1509.
- YOKOO, R. et al. (mar. 2012). « COSA-1 Reveals Robust Homeostasis and Separable Licensing and Reinforcement Steps Governing Meiotic Crossovers ». Dans : *Cell* **149.1**, page(s): 75–87.
- YOSHIDA, K et al. (avr. 1998). « The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. » English. Dans : *Molecular Cell* **1.5**, page(s): 707–718.
- YOUNDS, J. L. et al. (mar. 2010). « RTEL-1 Enforces Meiotic Crossover Interference and Homeostasis ». anglais. Dans : *Science* **327.5970**, page(s): 1254–1258.
- YOUNDS, J. L. et S. J. BOULTON (jan. 2011). « The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation ». anglais. Dans : *Journal of Cell Science* **124.4**, page(s): 501–513.
- YOUSAFZAI, F. K., N. AL-KAFF et G. MOORE (avr. 2010). « Structural and functional relationship between the Ph1 locus protein 5B2 in wheat and CDK2 in mammals ». English. Dans : *Functional & Integrative Genomics* **10.2**, page(s): 157–166.
- YUAN, J. et J. CHEN (juin 2013). « FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. » English. Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- ZAKHARYEVICH, K. et al. (déc. 2010). « Temporally and Biochemically Distinct Activities of Exo1 during Meiosis : Double-Strand Break Resection and Resolution of Double Holliday Junctions ». Dans : *Molecular Cell* **40.6**, page(s): 1001–1015.
- ZAKHARYEVICH, K., S. TANG, Y. MA et N. HUNTER (avr. 2012). « Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase ». Dans : *Cell* **149.2**, page(s): 334–347.

- ZANDERS, S. et E. ALANI (juil. 2009). « The pch2 Δ Mutation in Baker's Yeast Alters Meiotic Crossover Levels and Confers a Defect in Crossover Interference ». English. Dans : *PLoS genetics* **5.7**, page(s): e1000571.
- ZETKA, M. C., I. KAWASAKI, S. STROME et F. MÜLLER (1999). « Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation ». Dans : *Genes & Development* **13.17**, page(s): 2258–2270.
- ZHANG, C. et al. (juil. 2012). « The *Arabidopsis thaliana* DSB FORMATION (AtDFO) Gene is Required for Meiotic Double Strand Break Formation ». English. Dans : *The Plant Journal* **72.2**, page(s): 271–281.
- ZHANG, D., G. C. ROGERS, D. W. BUSTER et D. J. SHARP (avr. 2007). « Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. » anglais. Dans : *The Journal of Cell Biology* **177.2**, page(s): 231–242.
- ZHANG, L., Z. LIANG, J. HUTCHINSON et N. KLECKNER (jan. 2014a). « Crossover Patterning by the Beam-Film Model : Analysis and Implications ». English. Dans : *PLoS genetics* **10.1**, page(s): e1004042.
- ZHANG, L. et al. (2014b). « Topoisomerase II Mediates Meiotic Crossover Interference ». Dans : *Nature*, page(s): 1–21.
- ZHANG, Q., E. FISHEL, T. BERTROCHE et R. DIXIT (nov. 2013). « Microtubule Severeing at Crossover Sites by Katanin Generates Ordered Cortical Microtubule Arrays in *Arabidopsis* ». Dans : *Current biology : CB* **23.21**, page(s): 2191–2195.
- ZHAO, Q. et al. (déc. 2013). « The MHF complex senses branched DNA by binding a pair of crossover DNA duplexes ». Dans : *Nature Communications* **5**, page(s): 1–12.
- ZHU, Z., W.-H. CHUNG, E. Y. SHIM, S. E. LEE et G. IRA (sept. 2008). « Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends ». English. Dans : *Cell* **134.6**, page(s): 981–994.
- ZICKLER, D et N KLECKNER (1999). « Meiotic chromosomes : integrating structure and function ». Dans : *Annual review of genetics*, page(s): 1–158.
- ZICKLER, D. (mar. 2006). « From early homologue recognition to synaptonemal complex formation ». English. Dans : *Chromosoma* **115.3**, page(s): 158–174.
- ZIERHUT, C., M. BERLINGER, C. RUPP, A. SHINOHARA et F. KLEIN (mai 2004). « Mnd1 Is Required for Meiotic Interhomolog Repair ». English. Dans : *Current Biology* **14.9**, page(s): 752–762.

QUATRIÈME PARTIE

Annexe

Tinkering with meiosis

Wayne Crismani, Chloé Girard and Raphael Mercier*

Author affiliations

INRA, UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

*corresponding author: raphael.mercier@versailles.inra.fr.

Tel: +33130833989

Keywords: apomixis, crossover, diploid gametes, haploid, meiosis, recombination, reverse breeding, plant breeding

ABSTRACT

Meiosis is at the heart of Mendelian heredity. Recently, much progress has been made in the understanding of this process, in various organisms. In the last fifteen years, the functional characterization of numerous genes involved in meiosis has dramatically deepened our knowledge of key events, including recombination, cell cycle and chromosome distribution. Through a constantly advancing tool set and knowledge base, a number of advances have been made that will allow manipulation of meiosis from a plant breeding perspective. This review focuses on the aspects of meiosis that can be tinkered with to create and propagate new varieties.

We would like to dedicate this review to the memory of Simon W. Chan (1974-2012)
<http://www.plb.ucdavis.edu/labs/srchan/>

INTRODUCTION

In the coming decades high quality food must be produced to feed billions of people on this planet (Tester and Langridge 2010). Research is making advances on how this may be possible by introgressing certain traits, more specifically alleles of genes, into the elite crop varieties that already exist. Methods are required to transfer genetic material between plant varieties. For this to occur, with the exception of transgenesis, the genetic material must pass by a peculiar cell division known as meiosis. Meiosis generates genetic diversity and maintains ploidy (the number of sets of chromosomes in a cell) through successive generations. During meiosis, chromosomes which will be transmitted to the next generation are recombined, redistributed and then their number halved. Molecular data on plant meiosis has rapidly been accumulating in the last decade, mostly in the model species *Arabidopsis thaliana*, but notably also in rice (*Oriza sativa*) and maize (*Zea maiz*). This led to the functional characterization of over sixty genes involved in various aspects of meiosis, from recombination to cell cycle and chromosome movement. A more global view of plant meiosis mechanism is thus emerging, as described in several recent reviews (Osman et al. 2011; Berchowitz and Copenhaver 2010; Harrison et al. 2010; Mercier and Grelon 2008). Such a global understanding of these meiotic mechanisms, beyond its intrinsic scientific interest, opens up novel applied possibilities. In this review, we describe how tinkering with the basic

mechanisms of meiosis provide potential new technologies to control plant reproduction, such as mastering the level of recombination, manipulation of the ploidy of gametes, re-creation of parental plants from a hybrid, and the implementation of clonal reproduction through seeds.

Wild type meiosis: how to make recombined haploid gametes

Two major features define meiosis: recombination that produces a patchwork of the pre-meiotic chromosomes and reduction of ploidy by half (Fig. 1). Ploidy is reduced because two rounds of chromosome distribution follow a single replication. Homologous chromosomes are separated at the first division, and sister chromatids are separated at the second division. To be more accurate, this statement is correct because the chromosome identity is arbitrarily defined by its centromere. See in Fig. 1 that indeed at centromere chromosome distribution follows this rule, but that away from centromeres the occurrence of crossovers (COs), which are exchanges of continuity between two homologous chromatids, modifies this pattern. At both divisions, entities that will be separated must be physically connected beforehand. In the case of the first division, crossovers provide this link in partnership with sister chromatid cohesion (ensured by cohesins, a molecular glue that is established at the onset of their replication). This mechanical role of COs is crucial to understand and to tinker with meiosis. This is illustrated on Fig. 1: The two sister chromatids are held together by cohesins. A CO converts this inter-sister cohesion into an inter-homologue link. Hence, if the CO on Fig.1 is absent, there is no longer a link between the homologous chromosomes (Grelon et al. 2001). In such a case, chromosomes segregate randomly generating a high level of unviable aneuploid gametes. At anaphase I, sister chromatid cohesion is released from the chromosome arms, freeing the recombinant homologous chromosomes to migrate to opposite poles. However, sister chromatid cohesion is kept in centromeric regions and provides the link between the sister chromatids which is required for their segregation at the second division. The centromeric cohesion is released at anaphase II, allowing the distribution of sister chromatids.

Thus for a correct meiotic division certain requirements must be met: (1) at least one crossover must occur per pair of homologues (the so called obligate crossover). Note that only one chromatid from each homologue is engaged in any given crossover, thus even with the obligate crossover rule, some chromatids can be crossover free. (2) Cohesion between sister chromatids must be released along the arm at anaphase I but maintained at centromeres until being released at anaphase II. (3) Sister centromeres must co-segregate at first division and

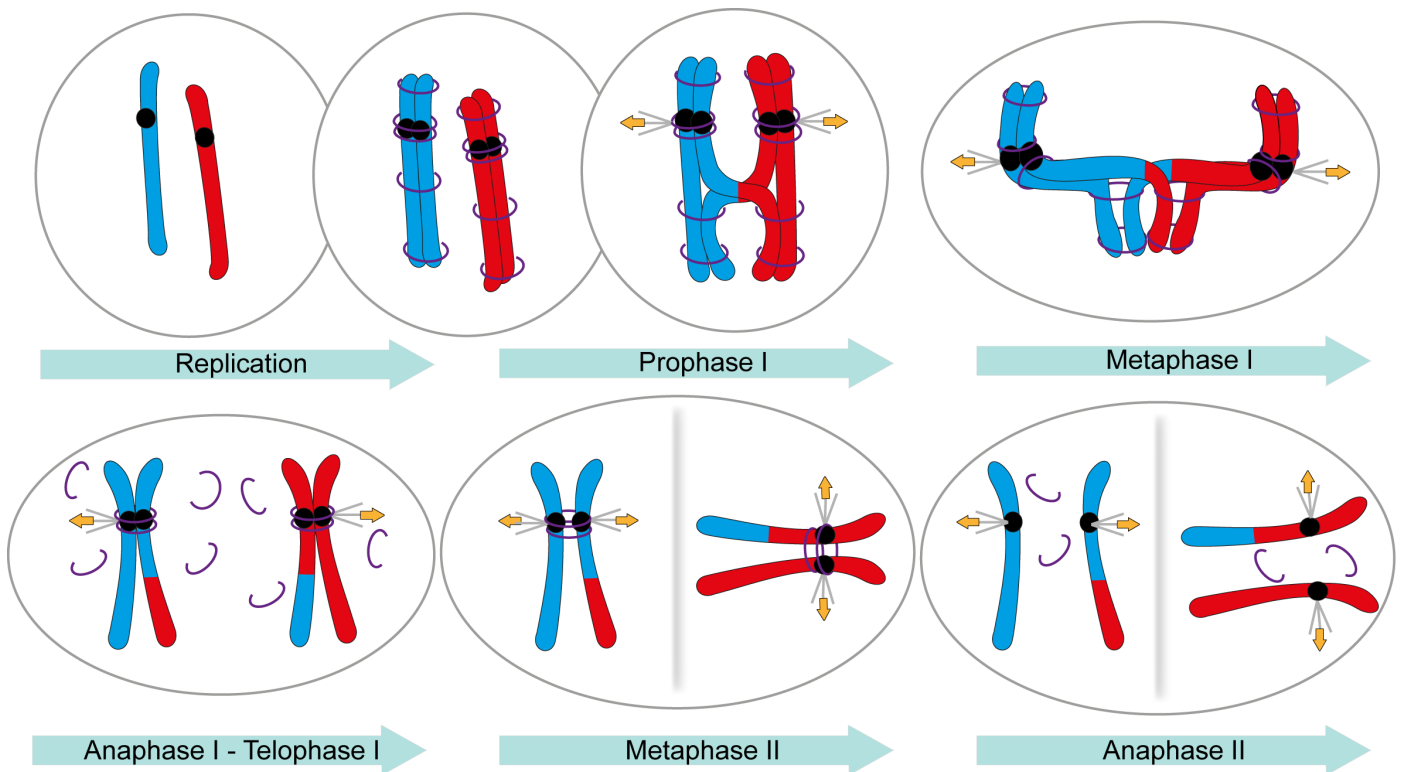


Figure 1. Chromosome behavior at meiosis.

Meiosis consists of two rounds of chromosome segregation following a single replication. At the onset of replication, the sister chromatids are held together by cohesion (purple rings). Homologous chromosomes pair during prophase I and engage in recombination: at least one crossover per pair of homologues is always observed. Crossovers and sister chromatid cohesion ensure that recombined chromosomes are physically linked to form a bivalent at metaphase I. At anaphase I, this cohesion is released except at the centromeres: homologous chromosomes segregate to opposite poles while sister chromatids remain together. At metaphase II, destruction of the centromeric cohesion allows the segregation of sister chromatids to opposite poles starting at anaphase II.

separate at second division. (4) The rule of the mitotic cell cycle must be bent to permit two divisions to follow a single replication.

Now, with the knowledge of how wild-type meiosis makes recombined haploid gametes, let's see how we can tinker with it.

Can crossover formation be controlled?

We explained above that there is at least one crossover per homologue pair. Surprisingly, in most species the frequency of crossover per pair of homologue does not deviate far above 1, typically in the range of 1-4 (chromosome genetic size of 50 to 200 cM), plants being no exception (see for example Giraut et al. 2011; Sim et al. 2012; Wei-Wei Zhang et al. 2012; Bowers et al. 2012; Cloutier et al. 2012; Guihua Zou et al. 2012; Hudson et al. 2012). This low level of COs occurs despite a large excess of DNA double-strand breaks which are the precursors of COs (estimated to be 20-40 fold in plants, with for example 230 DSBs (estimated with DMC1 foci) for about 11 COs in *Arabidopsis* (Chelysheva et al. 2007; Anderson and Stack 2005; Giraut et al. 2011). In addition, COs can also be largely confined to certain regions. In many species, a large proportion of the genome (proximal to the centromere) is CO free while there are many genes within these hyporecombinogenic regions (e.g. in melon and tomato (Garcia-Mas et al. 2012; The Tomato Genome Consortium 2012; Sim et al. 2012)). Another constraint on CO distribution is interference which prevents the occurrence of two close COs from occurring in a single meiosis. Hence interference prevents the recovery of double recombinants in a gamete, therefore easily adding one generation to the introgression of a chromosomal fragment of a limited size from one variety to another. Further, recombination tends to be inhibited in crosses involving distant relatives, while often desirable traits would ideally be introgressed into elite varieties from exotic germplasm (Gur and Zamir 2004). Because the CO number and distribution is tightly regulated, this limits the genetic diversity that could otherwise be created in breeding programs in addition to limits mapping and positional cloning power in research. Thus there is a clear interest for breeding programs to be able to control the many aspects of recombination (Wijnker and de Jong 2008). A number of recent studies have provided clues how this may be achieved.

Homologous recombination

There is evidence showing that some simple methods can influence recombination rates. For example, using a very sensitive assay which measures male recombination in *Arabidopsis*, it has been shown that CO frequency can be slightly increased by using flowers from secondary and tertiary branches rather than from the primary bolt or by elevating temperature (Francis et al. 2007). A more pronounced effect is seen when comparing male with female in *Arabidopsis*: on average male crossover outnumbers female crossovers by 67%, with most of the difference coming from sub-telomeric regions. Hence, if you require a recombinant in *Arabidopsis*, it would probably be best to use a male as the source of gametes, using flowers from the secondary or tertiary branch from plants grown at 28°C. It will be interesting to test if these effects are seen in other plant species.

Natural variation has also been identified as a factor that can influence CO frequency in a number of species such as maize, barley, rice, soybean, *Arabidopsis*, cow and mouse (Bovill et al. 2009; Esch et al. 2007; Li and Pfeiffer 2009; Stefaniak et al. 2006; Sandor et al. 2012; Yandeau-Nelson et al. 2006). This suggests that naturally occurring alleles that convey increased recombination frequencies could be stacked into a single genotype to increase or decrease CO rates. A key factor here will be to identify the underlying factors that regulate the frequency of homologous recombination. Recent results also suggest that manipulating karyotype composition could be a way to increase CO frequency in *Brassica* (Leflon et al. 2010). Indeed, comparing recombination between two homologues, in the presence or absence of an extra set of homoeologous chromosomes (i.e. an allotriploid) showed a staggering six times average increase compared to the euploid control. While the mechanism behind this effect remains elusive, it is a tool that can be used in *Brassica* and potentially other plant species. Changes in ploidy level have also been associated with an increase in recombination rate (~1.5-fold) in *Brassica spp.* (Leflon et al. 2010) and in *Arabidopsis* (Pecinka et al. 2011), where the rates of meiotic recombination were higher in tetraploids compared to diploids. This observation also holds true when comparing the size of genetic maps between diploid and natural allotetraploid *Gossypium* species (Desai et al. 2006) suggesting that it may be a general trend.

While many genes involved in CO formation were identified (Osman et al. 2011), no reports that we are aware of indicated that tinkering with only these elements can lead to an increase of CO frequency. A possible explanation for this may be that known pro-crossover genes are not controlling CO frequency, but rather are indispensable machinery to form the COs that occur in wild-type. However these elusive factors that regulate CO numbers and distribution are starting to be discovered and can be offered to plant breeders. MSH2 (MutS Homologue 2) is part of a very conserved DNA mismatch repair system that can prevent recombination between DNA sequences that are not perfectly homologous. This can occur meiotically and somatically in species as diverse as yeasts, mosses and flowering plants (Trouiller et al. 2006; Emmanuel et al. 2006; Hunter et al. 1996). It has been shown in an *Atmsh2* mutant that meiotic recombination is increased by $\approx 40\%$ between two polymorphic *Arabidopsis* accessions, in one interval (Emmanuel et al. 2006). Hence from a plant breeding perspective, the mismatch repair system is probably part of the meiocyte's arsenal that prevents recombination between distantly related species. Exploiting this knowledge could allow a better control of introgression of foreign germplasm into elite varieties. Another mechanism that could be targeted to influence CO formation, is the DNA methylation machinery. Indeed the DNA hypomethylation *Arabidopsis* mutant *Atmet1* (*methyltransferase1*) shows elevated centromere-proximal COs, decreased peri-centromeric CO and increased distal CO (Yelina et al. 2012). Furthermore *Atmet1* and *Atddm1* (*decreased DNA methylation 1*) mutants, and *Atddm1*-derived epiRILS, show altered global distribution while the final genome-wide CO frequency is unchanged, thus demonstrating that CO distribution can indeed be modified (Mirouze et al. 2012; Melamed-Bessudo and Levy 2012; Yelina et al. 2012; Colomé-Tatché et al. 2012).

Finally, the mutation of a single gene, *AtFANCM*, has been shown to increase meiotic recombination on eight intervals by a factor of three (Crismani et al. 2012). FANCM, is a conserved helicase that also limits meiotic COs in the yeast *S. pombe* (Lorenz et al. 2012) and given the conservation of function of FANCM between two species as distant as *Arabidopsis* and *S. pombe*, it is reasonable to speculate that mutation of FANCM would have the same hyper-recombinogenic effect in other plants species. Interestingly, the extra COs that occur in *fancm* mutants are non-interfering (i.e. distributed independently from each other) (Crismani et al. 2012), which could facilitate the introgression of small fragments of chromosomes rather than undesirably large blocks. Tripling CO frequency (from ~ 2 to ~ 6 per chromosome)

does not affect meiotic chromosome distribution and fertility of the plant, which leaves the door open to see how high CO frequency can be increased by stacking all the effects known or to be discovered. We have no reason to think that plant species are anyway near to the limit of crossovers that the chromosomes can tolerate. Most plant chromosomes receive an average of 2 COs per meiosis (e.g. Giraut et al. 2011; Sim et al. 2012; Wei-Wei Zhang et al. 2012; Bowers et al. 2012; Cloutier et al. 2012; Guihua Zou et al. 2012; Hudson et al. 2012). However, for example, the biggest chromosomes of chicken (200 Mb) (Groenen et al. 2009) or budding yeast (1.5 Mb) receive an unusual average of ~10 CO per meiosis. Simply applying the yeast density of COs per Mb, bread wheat chromosome 3B, which measures 1 Gb, would receive more than 6000 CO. It is hard to believe that such an extreme situation could be reached, but it is equally difficult to predict toward what limit the number of COs can actually be manipulated.

Homoeologous recombination

Wild or distantly related species present a potential reservoir of genetic diversity which could be introgressed into a species of interest in a breeding program. However, meiosis is a species barrier which frequently prevents exactly this type of recombination which is termed homoeologous recombination. Homoeologous sequences are sequences which were once homologous in a common ancestor but have subsequently diverged during speciation and a hybridization event has brought these sequences back together in the same cell. These homoeologous sequences can align and interact (similar to the way two homologues would) and they can form COs. However, over-ruling mechanisms typically prevent this homoeologous recombination. Indeed, these mechanisms are required to ensure fertility and to maintain genome stability in allopolyploids where multiple similar genomes are present in the same nucleus. One of the best known examples is the *Ph1* locus in allohexaploid bread wheat (Griffiths et al. 2006; Sears and Okamoto 1958; Riley and Chapman 1958; Riley et al. 1960) which prevents recombination between homoeologous chromosomes and hence this polyploid shows diploid-like behavior at meiosis. The naturally occurring mechanisms which prevent homoeologous recombination provide a major stumbling block for breeding programs as not only can introgressing a trait (gene) from wild germplasm be very difficult but equally so when backcrossing out undesirable linked traits in subsequent generations.

Fortunately some tools exist to partially mitigate these constraints, e.g. the deletion of the *Ph1* locus in bread wheat allows some recombination between homoeologous regions, which for

many decades has been used in plant breeding programs. For example, a *phl* mutant was exploited to break the linkage between a desirable and an undesirable trait that were introgressed into bread wheat from Imperial rye (Anugrahwati et al. 2008). The *Phl* locus was reduced to a cluster of *CDC2*-like genes (Griffiths et al. 2006) which have homology to mammalian *CDK2*. Subsequently, by exploiting the knowledge that globally the *CDC2-like* genes are overexpressed in *phl* (Al-Kaff et al. 2008), an appropriate chemical treatment was tested in an attempt to phenocopy the effects of *phl*. An okadaic acid treatment, which stimulates the effects of *CDK2*, obtained promising results on metaphase I spreads which showed increased chromosome interactions in wheat-rye hybrids (Knight et al. 2010). Another potential tool would be to develop wheat lines containing the dominant *Aegilops speltoides* genes that suppress *Phl* activity thereby allowing increased gene transfer (Dvorak et al. 2006). The advantage of developing methods such as the okadaic acid treatment and *Ae. speltoides*-derived suppressors is that they are readily reversible when compared to breeding strategies relying on recessive mutations (e.g. *phl* deletion mutants). This is important because as mentioned above, *Phl*-like machinery is essential for maintaining fertility and genome stability in allopolyploids and its function must be restored after the desired recombinants are obtained. Hence these strategies may provide plant breeders with simpler means to increase introgression of alien chromatin into elite varieties. Indeed, mechanisms which ensure diploid-like behavior at meiosis and hence fertility are not limited to bread wheat. In *Brassica napus*, it was discovered that there was natural variation for homoeologous CO frequency, with a major locus called *PrBn* (Jenczewski et al. 2003; Cifuentes et al. 2010; Nicolas et al. 2009). The locus has not been cloned yet, but could be already used to tinker with homoeologous recombination.

Making diploid gametes.

Diploid gametes (2n gametes) are abnormal gametes, as they have the somatic level of ploidy rather than half. If such gametes participate in fertilisation, this leads to an increase of ploidy of the offspring compared to the parent. It is generally accepted that whole genome duplications that occurred in the evolution of many lineages of eukaryotes, and particularly frequently in plants, originated from sexual polyploidizations through 2n gametes (Ramanna and E Jacobsen 2003). From an applied perspective, diploid gametes can allow crosses between related species with different levels of ploidy. This has been used to transfer genetic diversity from diploids, through 2n gametes, to polyploid crop varieties as demonstrated for

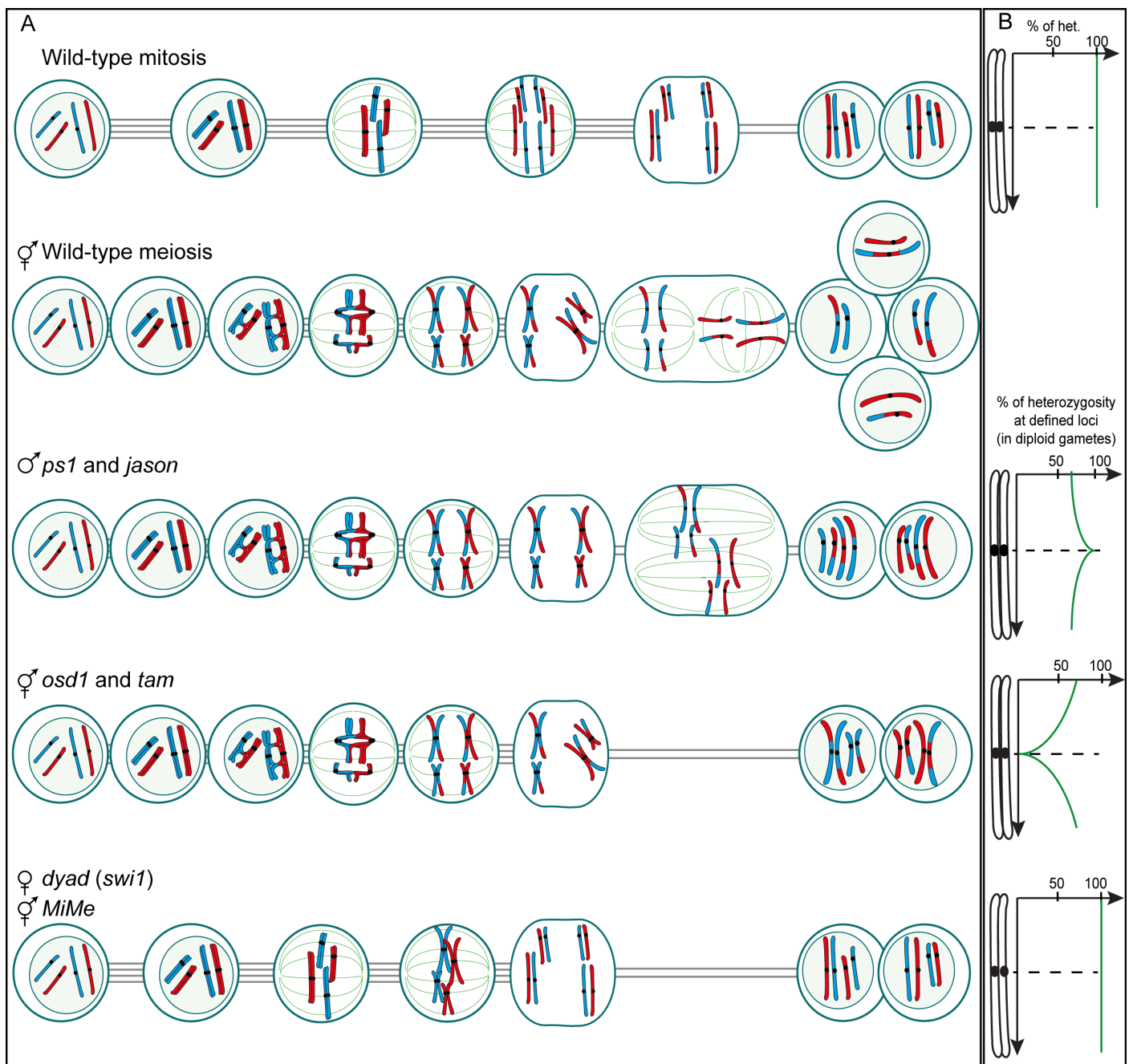


Figure 2. Mutants producing diploid gametes in *Arabidopsis thaliana*.

(A) Schematic representation of chromosome behavior at mitosis and at meiosis in wild type and in mutants producing diploid gametes. For simplification only two pairs of chromosomes are represented. **(B)** Genetic content of the resulting diploid cells or gametes: The frequency of heterozygosity in the gametes (i.e. from an A/a parent, % of diploid gametes being A/a, and not A/A or a/a), is represented according to the position of genetic marker along the chromosome. During mitosis in diploid cells, chromosomes replicate and sister chromatids segregate to opposite poles and produce two diploid daughter cells. The resulting cells are identical to the mother cell, retaining 100% heterozygosity from the mother cell all along the genome. During meiosis, replicated homologous chromosomes pair and engage in recombination, then segregate to two opposite poles. Sister chromatids are separated at meiosis II and four recombined haploid spores are formed. During meiosis in *Atps1* or *jas* mutants, recombined chromosomes are segregated normally during the first division but are pooled back together on a single metaphase II plate because of parallel or fused spindles. Sister chromatids are then segregated during anaphase II. This mechanism mimics the absence of first division, as only the segregation of sister chromatids is effective, but recombination occurred. Consequently, heterozygosity is conserved close to centromere (all the gametes are A/a at centromeric loci) but is decreased towards telomeres (2/3 Aa and 1/3 A/A or a/a). In contrast, in *osd1* or *tam* mutants, the first division occurs normally, the homologous chromosomes are separated, but the omission of the second meiotic division enables sister chromatids to remain together in the same daughter cell. Thus the heterozygosity of the parent is lost at the centromeres (all the gametes are either A/A or a/a, never A/a at centromeric loci). However, crossovers shuffle the chromatids and the frequency of heterozygote gametes (A/a) tends towards 2/3 at loci away from centromeres. Finally, in a *dyad* or a *MiMe* mutant, meiosis is replaced by a mitosis-like division (with a higher efficiency in *MiMe*). The genetic information (notably heterozygosity at all loci) from the mother cell is conserved all along the chromosomes since neither recombination nor the second meiotic division occurred.

example in potato or alfalfa (Peloquin et al. 1999; Ramanna and E Jacobsen 2003). Fertilisation involving $2n$ gametes, could be also used to produce synthetic vigorous tetraploid or triploid individuals, whose sterility is a suited character in some species (e.g. seedless banana, watermelon and oyster) (Heslop-Harrison and Schwarzacher 2007). In addition, $2n$ gametes can be used to produce innovative powerful mapping populations (Van Dun and Dirks 2006). Various meiotic defects (see below) can lead to the production of diploid gametes. It has been known for a long time that $2n$ gamete production is under genetic control and a series of mutants producing $2n$ gametes have been described in various plants (Cai and Xu 2007; Ramanna and E Jacobsen 2003), but only a few responsible genes have been recently identified, shedding light on the molecular control of $2n$ gamete formation.

Making diploid gametes *via* spindle orientation defects

The first cloned gene whose mutation leads to the production of diploid gamete at a high frequency is *Arabidopsis thaliana* *PARALLEL SPINDLE 1* (*AtPSI*) (d' Erfurth et al. 2008). The same phenotype was subsequently observed in *jason* mutants (Erilova et al. 2009; De Storme and Geelen 2011). In wild-type male meiosis of *Arabidopsis*, no cytokinesis is observed before telophase II, meaning that the two sets of chromosomes formed after the first division remain in a common cytoplasm. During metaphase II, the two spindles are roughly perpendicular to each other, leading to four well-separated poles at anaphase II. The *Atps1* and *jas* mutants present fused or parallel spindles in male meiosis II (Fig. 2A). Thus, the two sets of chromosomes that were separated during the first division are re-gathered into a single metaphase plate. This creates a situation where it is as if the first segregation did not occur, and the resulting $2n$ gametes are called FDR gametes (first division restitution), but with recombination. Because the fusion of the spindle is not complete in all meiocytes, ~60% of gametes are diploid, but ~40% are haploid. When using genetics to analyse products of meiosis in *Atps1* or *jas*, a mitotic-like division is observed, but with meiotic recombination occurring: i.e. the recombined sister chromatids are segregated to opposite poles. The resulting $2n$ gametes are heterozygous at centromeres (because sister centromeres are separated from one another, one copy of each homologous chromosome in each gamete) and tend towards random segregation at loci away from the centromeres because of recombination (66 % of heterozygosity, i.e. from an A/a parent, genotype of non-centromeric loci would be $2/3 A/a$, $1/6 AA$, $1/6 aa$) (Fig. 2B). As *Atps1* and *jas* affect only male meiosis, spontaneous triploid progeny is recovered after self-pollination, resulting from the fusion of $2n$ male

gametes with 1n female gametes. While the molecular function of *AtPS1* remains elusive, it has been suggested that JASON positively regulates *AtPS1* transcription levels (De Storme and Geelen 2011).

Making diploid gametes by skipping the second division

Another way of producing diploid gametes is to simply skip the second division (giving so called SDR gametes, for second division restitution). Only two genes whose mutation gives this phenotype have been isolated. The *Arabidopsis osd1* (omission of second division) and *tam* (initially described as tardy asynchronous meiosis (Magnard et al. 2001; Wang et al. 2004)) mutants skip the second meiotic division, producing dyads instead of tetrad of spores (Wang et al. 2010; d' Erfurth et al. 2010, 2009). In both *osd1* and *tam* mutants, prophase and meiosis I are indistinguishable from the equivalent stages in wild type with recombination and segregation of homologous chromosomes. From there, the resulting two sets of chromosomes will constitute the genome of the gametes, omitting the second meiotic division (Fig 2A). As these mutations affect both male and female meiosis, 4n plants are recovered when selfed. Both genes are components of the cell cycle machinery, and contribute to the cell cycle-specific regulation that allows a second division to occur without an intervening replication at meiosis. TAM is one of the 10 A type cyclins of *Arabidopsis thaliana* (CYCA1;2). TAM is involved in all the meiotic cell cycle transitions (Bulankova et al. 2010; d' Erfurth et al. 2010; Cromer et al. 2012). OSD1 is a regulator of the Anaphase Promoting Complex (APC) (Cromer et al. 2012; Iwata et al. 2011), a conserved component of the cell cycle machinery, which notably destroys cyclins to promote exit from mitosis or meiosis (Cooper and Strich 2011). Genetically, as the sister kinetochores migrate together at meiosis I in *tam* and *osd1*, the diploid gametes are systematically homozygous close to centromeres (Fig. 2B). Away from centromere, recombination distributes the alleles towards randomness (66% of heterozygosity).

Making diploid gametes by turning meiosis into mitosis

Finally, diploid gametes can be produced by turning meiosis into a single, mitotic-like division. As such, any heterozygosity present in the parent is transmitted into the 2n gamete. This is observed in mutants of several genes. In maize, the dominant mutation of *AGO104* (which belongs to the *ARGONAUTE* multigenic family acting on transcriptional and post-transcriptional gene silencing as well as on RNA interference) leads to the production of 30-

40% of unreduced gametes in both male and female (Singh et al. 2011). A histone modification marker, used to discriminate meiosis from mitosis, suggests that meiocytes in *ago104* undergo mitotic-like division rather than a meiotic division. Interestingly, maize *AGO104* is an orthologue of *AGO9* of Arabidopsis and *Atago9* mutants show spontaneous development of somatic cells into functional diploid gametes (completely skipping meiotic development, so called apospory) (Olmedo-Monfil et al. 2010). Other maize mutations in the epigenetic machinery can induce phenotypes reminiscent of mitotic-like divisions at meiosis (Garcia-Aguilar et al. 2010).

The *SWII/DYAD/DSY10* gene was identified more than a decade ago, and its molecular function remains elusive despite the characterization of a range of mutant alleles (Mercier et al. 2001; Agashe et al. 2002; Boateng et al. 2008; Mercier et al. 2003; Siddiqi et al. 2000; Xue and Makaroff 2001). While male meiosis is variously affected, female meiosis appears to be similarly modified in all of them. Indeed, in female meiosis 10 univalents are observed, with a balanced segregation of the sister chromatids, mimicking mitosis. The fertility of these plants is massively reduced, but among the few seeds produced, 78% originates from a mitotically derived female gamete (Fig. 2A) (Ravi et al. 2008). The same phenotype is observed in maize when AM1, the orthologue of SWII/DYAD is mutated (Pawlowski et al. 2009). Furthermore, it has been shown that the rare spontaneous descendants of *dyad* are triploid, resulting from the fertilization of a mitotically-derived unreduced female gametophyte by reduced pollen (Ravi et al. 2008).

2n mitotic-like gametes can be obtained at a frequency of 100% by combining mutations that abolish each of the features that distinguish meiosis from mitosis (d' Erfurth et al. 2009). The first feature is recombination, that can be eliminated by mutating the very conserved function of SPO11 (Grelon et al. 2001). SPO11 is essential for the formation of DNA double-strand breaks and thus the initiation of meiotic recombination. Hence in a *spo11* mutant, no recombination can take place, leading to the random segregation of 10 univalents. Second, to convert meiosis into mitosis, sister kinetochores (and hence sister chromatids) must have bipolar orientation rather than monopolar orientation as they would during meiosis. Mutation of *REC8* can satisfy this need. REC8 is a protein that ensures sister chromatid cohesion in meiosis (Bai et al. 1999; Bhatt et al. 1999). Hence a *spo11 rec8* double mutant shows a balanced segregation of the two sets of 10 sister chromatids in meiosis I (Chelysheva et al. 2005), mimicking a mitosis at first division. However, as the second division occurs in this

double mutant, the resulting free chromatids are unable to align at metaphase II and segregate randomly. Thus the last feature that has to be removed to convert meiosis into mitosis, is the occurrence of a second division, which can be achieved by mutating OSD1 or TAM (see above). In a triple *spo11 rec8 osd1* (d' Erfurth et al. 2009), or in a *spo11 rec8 tam* (d' Erfurth et al. 2010) the two sets of 10 chromatids segregate perfectly once, and since no further division occurs, diploid gametes are obtained *via* a mitosis-like division instead of meiosis (see figure 1 in d' Erfurth et al. (2009) for a graphical explanation). Hence this triple mutant, *spo11 rec8 osd1*, is called *MiMe* for *Mitosis instead of Meiosis*, and performs mitosis instead of meiosis at a rate of 100%. Self-fertilisation involving the clonal 2n gametes leads to doubling of ploidy at each generation

Genetic content of unreduced gametes differs

According to the mechanism of 2n gamete production, their genetic content may dramatically differ (Fig. 2B). This must be taken into account from an applied perspective to maximize the transfer of desirable alleles. There are two main features controlling the genotype of diplogametes: segregation of homologous or sister chromatids (more accurately their centromeres) and presence or absence of recombination. In the case of a mitotic-like division (e.g. *dyad*, *MiMe*), sister chromatids segregate without recombination, making 2n gametes genetically identical to their parent. In the case of *Atps1* and *jas*, sister centromeres also segregate from each other, but in this case recombination occurred. Thus, heterozygosity is conserved at centromeres (if the parental plant was A/a, 2n gametes would be systemically A/a) and tends to be reduced toward randomness (2/3 A/a, 1/6 AA, 1/6 aa) away from centromeres (Fig. 2B). The opposite effect is seen in *osd1* or *tam* mutants, sister centromeres migrate together and recombination occurs. Thus heterozygosity is completely lost at centromeres (i.e. the diploid parental plant being A/a, 2n gametes will be either A/A or a/a, never A/a). Away from centromeres, and because of recombination, the genetic composition of unreduced *osd1* and *tam* gametes tends towards randomness (2/3 heterozygous).

Getting rid of recombination: how to fix the ideal genotype

Hybrids often have better field quality than their parent. This phenomenon called hybrid vigor or heterosis is widely exploited in plant and animal breeding, although its mechanism remains elusive (Chen 2010). F1 hybrids must be recreated continually because genetic segregation

eliminates half of the heterozygosity in the F2 (97% by the F6) and would thus rapidly dilute the heterosis effect.

Reverse breeding

In traditional plant breeding, to take advantage of heterosis, the selection is applied to homozygous lines on the ability to produce the best hybrid (F1) when crossed by another genetically distinct homozygous line. The plants that are selected and the ones that express the sought phenotype are thus not the same. Reverse breeding is a novel plant breeding strategy that proposes to do it with a top down approach. First the best hybrid is selected and then the parental lines are recreated (Dirks et al. 2009). This strategy produces homozygous parental lines from any heterozygous plant and is based on the abolition of CO formation in the heterozygote and the production of doubled haploid plants from the gametes free of COs. Selecting and crossing two lines with complementary sets of chromosomes allow the production of the hybrid at a commercial scale. This technique also allows the production of so called substitution lines which are for example heterozygous for only one chromosome, facilitating the selection of the best alleles carried by this chromosome. The feasibility has been recently demonstrated in the model *Arabidopsis* (Wijnker et al. 2012), using the extinction of DMC1 a gene required for CO formation in most eukaryotes, to abolish CO formation. Due to the loss of most, if not all COs, chromosomes segregate randomly but balanced gametes are produced at a rate close to the expected rate ($1/2^{\text{chromosome number}}$). These gametes have been turned into haploid plants using centromere mediated genome elimination (Ravi and Chan 2010) and then self-pollination resulted in double-haploid diploid plants which are homozygous at all loci in the genome. From these, both the original hybrid and a set of substitution lines have been obtained. The technique is therefore now a reality, however it can only be applied to crops with no more than 12 chromosomes, due to the difficulty in obtaining balanced gametes by chance, and in which spores can be regenerated into doubled haploids.

Apomixis

Apomixis is the asexual formation of a seed from maternal material. Importantly this means that meiosis is replaced by mitosis and theoretically that heterozygosity could be maintained through generations. This would provide a major simplification of the production of hybrids

that could be propagated indefinitely without losing the benefits of heterosis (Bicknel and Koltunow 2004).

Many plant species reproduce *via* apomixis (>400 known) however there is an under representation of important crop species that reproduce that way. This is speculated to have occurred by chance through human selection early in the history of agriculture (Bicknel and Koltunow 2004). Therefore the identification of the underlying genetic mechanisms would represent a holy grail for a simple way of increasing crop yields and global efforts are progressing towards identifying the genes required for apomixis. It is established that apomixis is under the genetic control of a limited number of loci, but the corresponding genes have not yet been identified (Pupilli and Barcaccia 2012; Koltunow et al. 2011; Koltunow et al. 2011). So far, the attempts to directly introgress apomixis into crops have been unsuccessful, making the identification and understanding of natural apomixis mechanisms crucial.

Another opportunity to introduce apomixis into plants exists through the possibility to engineer apomixis *de novo* through tinkering with sexual processes. The first step is to modify meiosis by turning it into a mitotic-like division, producing clonal gametes with the somatic level of ploidy as described above in *Arabidopsis* (*dyad*, *MiMe*, *ago104*, *ago9*). The second step is to produce seeds from these unreduced gametes, without any genetic contribution of another gamete. It could be achieved through parthenogenesis, or post-fertilization elimination of the unwanted chromosomes. The *Arabidopsis GEM* (Genome elimination) line provides the latter possibility, as the genome of the *GEM* line is eliminated post-fertilization when crossed to any other genotype (Ravi and Chan 2010). Indeed, when *GEM* was crossed to *dyad* or *MiMe*, clonal seeds were recovered (Marimuthu et al. 2011). This established that it is possible to mimic apomixis by tinkering with sexual processes. However the current system has some limitations, because it is still cross-dependent and does not recover clones at 100%. Future challenges include increasing the efficiency of clone production, reducing the dependence on a cross and making the system inducible.

Conclusion: The complete design

From the naïve view of a molecular geneticist, breeding can be summarized in two steps: to mix and to fix. The complete design would thus include a step of intense mixing (increased recombination) to provide new elite genotypes, that combine as many traits as desired, and then a step to fix and propagate the supreme individual at an industrial scale (apomixis or reverse breeding). Some genetic strategies have emerged recently to address these two issues, and one of the next challenges is to combine them. The other challenge is to transfer these technologies from model organisms like *Arabidopsis* to species as complex as wheat or rapeseed. Some obstacles stand in the way: the number of copies of each gene to tinker with due to polyploidy, the appropriate tools such as sequence information and mutant resources along with generation time and space limitations. However, there is no reason that the novel and future concepts developed in model plants could not be applied to crops.

Acknowledgements

We wish to thank Eric Jenczewski and Fabien Nogu   for critical reading of the manuscript. Research in the Mercier lab is currently funded by the EU-FP7 program (Meiosys-KBBE-2009-222883), a European Research Council Starting Independent Researcher Grants (Meiosight-20101109), the French National Research Agency and the Rijk Zwaan Company.

References

- Agashe B, Prasad CK, and Siddiqi I. 2002. Identification and analysis of DYAD: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 3935–43.
- Al-Kaff N, Knight E, Bertin I, Foote T, Hart N, Griffiths S, and Moore G. 2008. Detailed dissection of the chromosomal region containing the Ph1 locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling. *Annals of botany* **101**: 863–72.
- Anderson LK, and Stack SM. 2005. Recombination nodules in plants. *Cytogenetic and genome research* **109**: 198–204.
- Anugrahwati DR, Shepherd KW, Verlin DC, Zhang P, Mirzaghaderi G, Walker E, Francki MG, and Dundas IS. 2008. Isolation of wheat-rye 1RS recombinants that break the linkage between the stem rust resistance gene SrR and secalin. *Genome* **51**: 341–9.
- Bai X, Peirson BN, Dong F, Xue C, and Makaroff C a. 1999. Isolation and characterization of SYN1, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **11**: 417–30.
- Berchowitz LE, and Copenhaver GP. 2010. Genetic interference: don't stand so close to me. *Current genomics* **11**: 91–102.
- Bhatt AM, Lister C, Page T, Fransz P, Findlay K, Jones GH, Dickinson HG, and Dean C. 1999. The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *The Plant journal* **19**: 463–72.
- Bicknel R, and Koltunow AM. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant cell* **16 Suppl**: S228–45.
- Boateng K a, Yang X, Dong Fuqui, Owen H a, and Makaroff C a. 2008. SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. *Molecular plant* **1**: 620–33.
- Bovill WD, Deveshwar P, Kapoor S, and Able J a. 2009. Whole genome approaches to identify early meiotic gene candidates in cereals. *Functional & integrative genomics* **9**: 219–29.
- Bowers JE, Bachlava E, Brunick RL, Rieseberg LH, Knapp SJ, and Burke JM. 2012. Development of a 10,000 locus genetic map of the sunflower genome based on multiple crosses. *G3 (Bethesda, Md.)* **2**: 721–9.
- Bulankova P, Riehs-Kearnan N, Nowack MK, Schnittger A, and Riha K. 2010. Meiotic progression in *Arabidopsis* is governed by complex regulatory interactions between SMG7, TDM1, and the meiosis I-specific cyclin TAM. *The Plant cell* **22**: 3791–803.
- Cai, and Xu SS. 2007. Meiosis-driven genome variation in plants. *Current genomics* **8**: 151–61.

- Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot Ghislaine, Vrielynck N, Belcram K, Rocques N, Márquez-Lema A, Bhatt AM, Horlow C, et al. 2005. AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *Journal of cell science* **118**: 4621–32.
- Chelysheva L, Gendrot Ghislaine, Vezon D, Doutriaux M-P, Mercier Raphael, and Grelon M. 2007. Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **3**: e83.
- Chen. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in plant science* **15**: 57–71.
- Cifuentes M, Eber F, Lucas M-O, Lode M, Chèvre A-M, and Jenczewski E. 2010. Repeated polyploidy drove different levels of crossover suppression between homoeologous chromosomes in *Brassica napus* allohaploids. *The Plant cell* **22**: 2265–76.
- Cloutier S, Ragupathy R, Miranda E, Radovanovic N, Reimer E, Walichnowski A, Ward K, Rowland G, Duguid S, and Banik M. 2012. Integrated consensus genetic and physical maps of flax (*Linum usitatissimum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics*.
- Colomé-Tatché M, Cortijo S, Wardenaar R, Morgado L, Lahouze B, Sarazin A, Etcheverry M, Martin A, Feng S, Duvernois-Berthet E, et al. 2012. Features of the *Arabidopsis* recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2**: 16240–16245.
- Cooper KF, and Strich R. 2011. Meiotic control of the APC/C: similarities & differences from mitosis. *Cell division* **6**: 16.
- Crismani W, Girard Chloé, Froger N, Pradillo M, Santos JL, Chelysheva L, Copenhaver GP, Horlow C, and Mercier R. 2012. FANCM limits meiotic crossovers. *Science (New York, N.Y.)* **336**: 1588–90.
- Cromer L, Heyman J, Touati S, Harashima H, Araou E, Girard Chloe, Horlow C, Wassmann K, Schnittger A, De Veylder L, et al. 2012. OSD1 Promotes Meiotic Progression via APC/C Inhibition and Forms a Regulatory Network with TDM and CYCA1;2/TAM. *PLoS genetics* **8**: e1002865.
- Desai A, Chee P, Rong J, May O, and Paterson A. 2006. Chromosome structural changes in diploid and tetraploid A genomes of *Gossypium*. *Genome* **49**: 336–45.
- Dirks R, van Dun K, de Snoo CB, van den Berg M, Lelivelt CLC, Voermans W, Woudenberg L, de Wit JPC, Reinink K, Schut JW, et al. 2009. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant biotechnology journal* **7**: 837–45.
- Van Dun K, and Dirks R. 2006. Near Reverse Breeding. WO/2006/094773.
- Dvorak J, Deal KR, and Luo M-C. 2006. Discovery and mapping of wheat Ph1 suppressors. *Genetics* **174**: 17–27.

- Emmanuel E, Yehuda E, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N, and Levy A a. 2006. The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO reports* **7**: 100–5.
- d' Erfurth I, Cromer L, Jolivet S, Girard Chloé, Horlow C, Sun Y, To JPC, Berchowitz LE, Copenhaver GP, and Mercier Raphael. 2010. The cyclin-A CYCA1;2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. *PLoS genetics* **6**: e1000989.
- d' Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, and Mercier Raphael. 2009. Turning meiosis into mitosis. *PLoS biology* **7**: e1000124.
- d' Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Simon M, Jenczewski E, and Mercier Raphael. 2008. Mutations in AtPS1 (*Arabidopsis thaliana* parallel spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains. *PLoS genetics* **4**: e1000274.
- Erilova A, Brownfield L, Exner V, Rosa M, Twell D, Mittelsten Scheid O, Hennig L, and Köhler C. 2009. Imprinting of the polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* **5**: e1000663.
- Esch E, Szymaniak JM, Yates H, Pawlowski WP, and Buckler ES. 2007. Using crossover breakpoints in recombinant inbred lines to identify quantitative trait loci controlling the global recombination frequency. *Genetics* **177**: 1851–8.
- Francis, Lam SY, Harrison BD, Bey AL, Berchowitz LE, and Copenhaver GP. 2007. Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3913–8.
- Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, and Grimanelli D. 2010. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *The Plant cell* **22**: 3249–67.
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, et al. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 11872–7.
- Giraut L, Falque M, Drouaud J, Pereira L, Martin OC, and Mézard C. 2011. Genome-wide crossover distribution in *Arabidopsis thaliana* meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes. *PLoS genetics* **7**: e1002354.
- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, and Pelletier G. 2001. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *The EMBO journal* **20**: 589–600.
- Griffiths S, Sharp R, Foote TN, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, and Moore G. 2006. Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**: 749–52.

- Groenen M a M, Wahlberg P, Foglio M, Cheng HH, Megens H-J, Crooijmans RPM a, Besnier F, Lathrop M, Muir WM, Wong GK-S, et al. 2009. A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. *Genome research* **19**: 510–9.
- Gur A, and Zamir D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS biology* **2**: e245.
- Harrison CJ, Alvey E, and Henderson IR. 2010. Meiosis in flowering plants and other green organisms. *Journal of experimental botany* **61**: 2863–75.
- Heslop-Harrison JS, and Schwarzacher T. 2007. Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of botany* **100**: 1073–84.
- Hudson CJ, Freeman JS, Kullán AR, Petroli CD, Sansaloni CP, Kilian A, Detering F, Grattapaglia D, Potts BM, Myburg AA, et al. 2012. A reference linkage map for eucalyptus. *BMC genomics* **13**: 240.
- Hunter N, Chambers S, Louis E, and Borts R. 1996. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *The EMBO journal* **15**: 1726–33.
- Iwata E, Ikeda S, Matsunaga S, Kurata M, Yoshioka Y, Criqui M-C, Genschik P, and Ito M. 2011. GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the anaphase-promoting complex/cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in Arabidopsis. *The Plant cell* **23**: 4382–93.
- Jenczewski E, Eber F, Grimaud A, Huet S, Lucas MO, Monod H, and Chèvre AM. 2003. PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (Brassica napus) haploids. *Genetics* **164**: 645–53.
- Knight E, Greer E, Draeger T, Thole V, Reader S, Shaw P, and Moore G. 2010. Inducing chromosome pairing through premature condensation: analysis of wheat interspecific hybrids. *Functional & integrative genomics* **10**: 603–8.
- Koltunow AM, Johnson SD, and Okada T. 2011. Apomixis in hawkweed: Mendel's experimental nemesis. *Journal of experimental botany* **62**: 1699–707.
- Koltunow AM, Johnson SD, Rodrigues JCM, Okada T, Hu Y, Tsuchiya T, Wilson S, Fletcher P, Ito K, Suzuki G, et al. 2011. Sexual reproduction is the default mode in apomictic Hieracium subgenus Pilosella, in which two dominant loci function to enable apomixis. *The Plant journal* **66**: 890–902.
- Leflon M, Grandont L, Eber F, Huteau V, Coriton O, Chelysheva L, Jenczewski E, and Chèvre A-M. 2010. Crossovers get a boost in Brassica allotriploid and allotetraploid hybrids. *The Plant cell* **22**: 2253–64.
- Li, and Pfeiffer TW. 2009. Three cycles of recurrent selection for altered recombination frequency in maize. *Crop Science* **49**: 473.

- Lorenz A, Osman F, Sun W, Nandi S, Steinacher R, and Whitby MC. 2012. The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science* **336**: 1585–8.
- Magnard J-L, Yang M, Chen YC, Leary M, and McCormick S. 2001. The Arabidopsis gene tardy asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant physiology* **127**: 1157–66.
- Marimuthu MP a, Jolivet S, Ravi M, Pereira L, Davda JN, Cromer L, Wang L, Nogu   F, Chan SWL, Siddiqi I, et al. 2011. Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* **331**: 876.
- Melamed-Bessudo C, and Levy A a. 2012. Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E981–8.
- Mercier R, Armstrong SJ, Horlow C, Jackson NP, Makaroff CA, Vezon D, Pelletier G, Jones GH, and Franklin F Christopher H. 2003. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in Arabidopsis. *Development* **130**: 3309–18.
- Mercier R, and Grelon M. 2008. Meiosis in plants: ten years of gene discovery. *Cytogenetic and genome research* **120**: 281–90.
- Mercier R, Vezon D, Bullier E, Motamayor JC, Sellier A, Lefèvre F, Pelletier G, and Horlow C. 2001. SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes & development* **15**: 1859–71.
- Mirouze M, Lieberman-Lazarovich M, Aversano R, Bucher E, Nicolet J, Reinders J, and Paszkowski J. 2012. Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 5880–5.
- Nicolas SD, Leflon M, Monod H, Eber F, Coriton O, Huteau V, Chèvre A-M, and Jenczewski E. 2009. Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in Brassica napus haploids and hybrids. *The Plant cell* **21**: 373–85.
- Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Ar  valo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, and Vielle-Calzada J-P. 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* **464**: 628–32.
- Osman K, Higgins JD, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, and Franklin Frederick Christopher Hugh. 2011. Pathways to meiotic recombination in Arabidopsis thaliana. *The New phytologist* **190**: 523–44.
- Pawlowski WP, Wang C-JR, Golubovskaya IN, Szymaniak JM, Shi L, Hamant O, Zhu T, Harper L, Sheridan WF, and Cande WZ. 2009. Maize AME1OTIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3603–8.

- Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy A a, and Mittelsten Scheid O. 2011. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in Arabidopsis. *BMC biology* **9**: 24.
- Peloquin SJ, Boiteux LS, and Carputo D. 1999. Meiotic mutants in potato. Valuable variants. *Genetics* **153**: 1493–9.
- Pupilli F, and Barcaccia G. 2012. Cloning plants by seeds: Inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of biotechnology* **159**: 291–311.
- RILEY R, CHAPMAN V, and KIMBER G. 1960. Position of the Gene determining the Diploid-like Meiotic Behaviour of Wheat. *Nature* **186**: 259–260.
- Ramanna MS, and Jacobsen E. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement—A review. *Euphytica* **133**: 3–8.
- Ravi M, and Chan SWL. 2010. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464**: 615–8.
- Ravi M, Marimuthu MP a, and Siddiqi I. 2008. Gamete formation without meiosis in Arabidopsis. *Nature* **451**: 1121–4.
- Riley R, and Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **182**: 713–715.
- Sandor C, Li W, Coppieters W, Druet T, Charlier C, and Georges M. 2012. Genetic Variants in REC8, RNF212, and PRDM9 Influence Male Recombination in Cattle. ed. K. Paigen. *PLoS genetics* **8**: e1002854.
- Sears ER, and Okamoto M. 1958. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Int Proc 10th Int Cong Genet* **2**: 258–259.
- Siddiqi I, Ganesh G, Grossniklaus U, and Subbiah V. 2000. The dyad gene is required for progression through female meiosis in Arabidopsis. *Development* **127**: 197–207.
- Sim S-C, Durstewitz G, Plieske J, Wieseke R, Ganai MW, Van Deynze A, Hamilton JP, Buell CR, Causse M, Wijeratne S, et al. 2012. Development of a Large SNP Genotyping Array and Generation of High-Density Genetic Maps in Tomato ed. T. Yin. *PLoS ONE* **7**: e40563.
- Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C, Parrinello H, Michaud C, Leblanc O, and Grimanelli D. 2011. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *The Plant cell* **23**: 443–58.
- Stefaniak TR, Hyten DL, Pantalone VR, Klarer A, and Pfeiffer TW. 2006. Soybean Cultivars Resulted from More Recombination Events Than Unselected Lines in the Same Population. *Crop Science* **46**: 43.

- De Storme N, and Geelen D. 2011. The Arabidopsis mutant jason produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II. *Plant physiology* **155**: 1403–15.
- Tester M, and Langridge P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **327**: 818–22.
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635–41.
- Trouiller B, Schaefer DG, Charlot F, and Nogu   F. 2006. MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic acids research* **34**: 232–42.
- Wang, Magnard J-L, McCormick S, and Yang M. 2004. Progression through meiosis I and meiosis II in Arabidopsis anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant physiology* **136**: 4127–35.
- Wang Y, Jha AK, Chen R, Doonan JH, and Yang M. 2010. Polyploidy-associated genomic instability in Arabidopsis thaliana. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **48**: 254–63.
- Wijnker E, van Dun K, de Snoo CB, Lelivelt CLC, Keurentjes JJB, Naharudin NS, Ravi M, Chan SWL, de Jong H, and Dirks R. 2012. Reverse breeding in Arabidopsis thaliana generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nature genetics* **44**: 467–470.
- Wijnker E, and de Jong H. 2008. Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends in plant science* **13**: 640–6.
- Xue C, and Makaroff. 2001. The dsy10 Mutation of Arabidopsis results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sexual Plant Reproduction* **14**: 63–67.
- Yandeau-Nelson MD, Nikolau BJ, and Schnable PS. 2006. Effects of trans-acting genetic modifiers on meiotic recombination across the a1-sh2 interval of maize. *Genetics* **174**: 101–12.
- Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, Miller N, Drouaud J, Grelon M, Copenhaver GP, et al. 2012. Epigenetic Remodeling of Meiotic Crossover Frequency in Arabidopsis thaliana DNA Methyltransferase Mutants ed. G.S. Barsh. *PLoS Genetics* **8**: e1002844.
- Zhang W-W, Pan J-S, He H-L, Zhang C, Li Z, Zhao J-L, Yuan X-J, Zhu L-H, Huang S-W, and Cai R. 2012. Construction of a high density integrated genetic map for cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 249–59.
- Zou G, Zhai G, Feng Q, Yan S, Wang A, Zhao Q, Shao J, Zhang Z, Zou J, Han B, et al. 2012. Identification of QTLs for eight agronomically important traits using an ultra-high-density map based on SNPs generated from high-throughput sequencing in sorghum under contrasting photoperiods. *Journal of experimental botany* **63**: 5451–62.

Figure legends

Figure 1. Chromosome behavior at meiosis. Meiosis consists of two rounds of chromosome segregation following a single replication. At the onset of replication, the sister chromatids are held together by cohesion (purple rings). Homologous chromosomes pair during prophase I and engage in recombination: at least one crossover per pair of homologues is always observed. Crossovers and sister chromatid cohesion ensure that recombined chromosomes are physically linked to form a bivalent at metaphase I. At anaphase I, this cohesion is released except at the centromeres: homologous chromosomes segregate to opposite poles while sister chromatids remain together. At metaphase II, destruction of the centromeric cohesion allows the segregation of sister chromatids to opposite poles starting at anaphase II.

Figure 2. Mutants producing diploid gametes in *Arabidopsis thaliana*.

(A) Schematic representation of chromosome behavior at mitosis and at meiosis in wild type and in mutants producing diploid gametes. For simplification only two pairs of chromosomes are represented. (B) Genetic content of the resulting diploid cells or gametes: The frequency of heterozygosity in the gametes (i.e. from an A/a parent, % of diploid gametes being A/a, and not A/A or a/a), is represented according to the position of genetic marker along the chromosome. During mitosis in diploid cells, chromosomes replicate and sister chromatids segregate to opposite poles and produce two diploid daughter cells. The resulting cells are identical to the mother cell, retaining 100% heterozygosity from the mother cell all along the genome. During meiosis, replicated homologous chromosomes pair and engage in recombination, then segregate to two opposite poles. Sister chromatids are separated at meiosis II and four recombined haploid spores are formed. During meiosis in *Atps1* or *jas* mutants, recombined chromosomes are segregated normally during the first division but are pooled back together on a single metaphase II plate because of parallel or fused spindles. Sister chromatids are then segregated during anaphase II. This mechanism mimics the absence of first division, as only the segregation of sister chromatids is effective, but recombination occurred. Consequently, heterozygosity is conserved close to centromere (all the gametes are A/a at centromeric loci) but is decreased towards telomeres (2/3 Aa and 1/3 A/A or aa). In contrast, in *osd1* or *tam* mutants, the first division occurs normally, the homologous

chromosomes are separated, but the omission of the second meiotic division enables sister chromatids to remain together in the same daughter cell. Thus the heterozygosity of the parent is lost at the centromeres (all the gametes are either A/A or a/a , never A/a at centromeric loci). However, crossovers shuffle the chromatids and the frequency of heterozygote gametes (A/a) tends towards $2/3$ at loci away from centromeres. Finally, in a *dyad* or a *MiMe* mutant, meiosis is replaced by a mitosis-like division (with a higher efficiency in *MiMe*). The genetic information (notably heterozygosity at all loci) from the mother cell is conserved all along the chromosomes since neither recombination nor the second meiotic division occurred.

Resumé

La grande majorité des espèces forment très peu de crossovers (CO) par chromosome en méiose, et ce quelle que soit la taille des chromosomes et en dépit de l'excès de précurseurs de recombinaison disponibles. Les mécanismes qui sous-tendent cette limitation restent, pour une grande part, inconnus.

Un crible génétique visant la restauration de la fertilité de mutants déficients en CO (ex : les *zmm*) nous a permis d'identifier FANCM comme un régulateur majeur de la formation des CO méiotiques, en limitant la voie dépendante de MUS81, normalement minoritaire chez *Arabidopsis* (CRISMANI et al. 2012). Nous avons alors montré que deux des cofacteurs de FANCM au sein de la voie de l'anémie de Fanconi (FA), MHF1 et MHF2, agissent dans la même voie pour limiter les CO. En dehors de ces trois protéines, les autres protéines FA ne sont pas des protéines anti-CO (GIRARD et al. 2014).

Nous avons ensuite identifié FIDGETIN-Like-1 comme une protéine anti-CO agissant en parallèle de FANCM. En effet, si les deux mutations *figl1* et *fancm* alimentent la voie dépendante de MUS81 de formation des CO, leurs effets sont cumulatifs et mènent à une augmentation d'un facteur 6 du nombre CO par méiose, et ce sans affecter la ségrégation des chromosomes. Ce résultat montre que FIGL1 et FANCM agissent à deux étapes indépendantes de la recombinaison, et nos données suggèrent que FIGL1 pourrait agir en amont de FANCM.

Ce travail a révélé l'existence d'au moins deux mécanismes de limitation des CO méiotiques, et montre que la fréquence de CO peut être largement augmentée sans que la ségrégation des chromosomes ne soit affectée.

Summary

Most species only have few meiotic crossovers (COs) per chromosome irrespective of their physical size and despite an excess of recombination precursors. However, the underlying mechanisms constraining CO frequency remain largely unknown.

Using a genetic screen aiming at restoring fertility of CO-deficient mutants (e.g. *zmm*), we first identified FANCM as a major anti-CO protein limiting MUS81-dependent COs, a normally minor pathway in *Arabidopsis* (CRISMANI et al. 2012). We then showed that two of FANCM's cofactors from the Fanconi anemia pathway of DNA repair, namely MHF1 and MHF2, act along FANCM to limit meiotic crossovers, whereas the other Fanconi proteins do not (GIRARD et al. 2014).

Another mutant revealed FIDGETIN-Like-1 (FIGL1) as an anti-CO factor that acts in parallel to FANCM. While both *figl1* and *fancm* mutations fuel the MUS81-dependent CO pathway, the effect of both mutations is cumulative, leading to a six-fold increase in CO formation, without impairing chromosome segregation. This shows that FIGL1 and FANCM act independently, and our data suggest that FIGL1 could act at an earlier step in the recombination pathway than FANCM.

This work reveals that at least two different mechanisms limit meiotic CO number and shows that CO frequency can be largely increased without affecting chromosome distribution at meiosis.